

ENTWICKLUNG VON GRANULOZYTÄREN ZELLEN
UND MAKROPHAGEN WÄHREND DER KULTIVIERUNG
VON ZELLEN AKUTER LYMPHOBLASTISCHER LEUKÄMIEN
VOM COMMON-TYP IN DIFFUSIONSKAMMERN

Disbui. München

1988

Ursula M. I. Just





Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555213_0036

Aus der Abteilung für Experimentelle Hämatologie am Institut für
Hämatologie der Gesellschaft für Strahlen- und
Umweltforschung mbH
München

Leiter: Prof. Dr. P. Dörmer

ENTWICKLUNG VON GRANULOZYTÄREN ZELLEN UND MAKROPHAGEN WÄHREND DER
KULTIVIERUNG VON ZELLEN AKUTER LYMPHOBLASTISCHER LEUKÄMIEN
VOM COMMON-TYP IN DIFFUSIONSKAMMERN

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Ursula M. I. Just

aus

Freyung

Jahr

198 8

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:

Dr. med. Dr. med. habil.

Barbara Lau

Mitberichterstatter:

Prof. Dr. R. J. Haas

Prof. Dr. W. Wilmanns ..

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter:

.....

Dekan:

Prof. Dr. W. Lamm

Tag der mündlichen Prüfung:

9. Juni 88

Inhaltsverzeichnis

	Seite
ZUSAMMENFASSUNG	IV
BILDVERZEICHNIS	VI
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	IX
1 DIFFERENZIERUNGSKAPAZITÄT VON ZELLEN AKUTER LEUKÄMIEN	 1
2 GRUNDLAGEN	4
2.1 Hämatopoese	4
2.2 Immunologische Charakterisierung von akuten lymphoblastischen Leukämien	 11
2.3 In-vivo-Kultivierung und -Klonierung von hämatopoetischen Zellen in Diffusions- kammern	 16
3 MATERIAL UND METHODEN	22
3.1 Zellen	22
3.2 In-vivo-Kultivierung von hämatopoetischen Zellen unter besonderer Berücksichtigung der Granulopoese	 24
3.2.1 Diffusionskammer-Technik	24
3.2.2 Klonierung granulopoetischer Vorläuferzellen in Diffusions- kammern (CFU-DG)	 28
3.3 In-vitro-Kultivierung von granulozytären Vorläuferzellen (CFU-C)	 30
3.4 Morphologische Klassifizierung von Zellen	32
3.4.1 Morphologische Klassifizierung leukämischer Zellen	 32
3.4.2 Morphologische Klassifizierung von Diffusionskammerzellen	 32
3.4.3 Morphologische Klassifizierung der Kolonien bei der CFU-DG-Methode	 33

3.5	Zytochemische Farbreaktionen von Zellen der granulozytären und monozytären Reihe	34
3.5.1	Naphthol-AS-Azetat-Esterase	34
3.5.2	Naphthol-AS-D-Chlorazetat-Esterase	35
3.6	Immunologische Charakterisierung von Zellen	36
3.6.1	Antiseren	36
3.6.2	Immunfluoreszenz	37
3.6.3	Peroxidase-Antiperoxidase-Methode	38
3.6.4	Einfluß von Pronase auf Oberflächenantigene	38
3.7	Statistik	39
3.8	Experimentelles Design	39
4	ERGEBNISSE	42
4.1	Vergleich der Kultivierung mononukleärer Blutzellen von Patienten mit akuter lymphoblastischer Leukämie vom common- Typ und gesunden Probanden in Diffusionskammern	42
4.1.1	Analyse des Wachstums	42
4.1.2	Differenzierungsvermögen in die granulozytäre Reihe	47
4.2	Beziehung zwischen der granulozytären Differenzierung und der Anzahl der CFU-C bei gesunden Probanden und bei Patienten mit akuter lymphoblastischer Leukämie vom common-Typ	53
4.3	Klonierung von granulozytären Progeni- toren (CFU-DG) bei hämatologisch Gesun- den und Patienten mit akuter lymphoblasti- scher Leukämie vom common-Typ in Diffusionskammern	61
4.3.1	Wachstum	61
4.3.2	Analyse der Kolonien nach morpholo- gischen Kriterien	64

4.3.3	Anzahl der Kolonien bei hämatologisch gesunden Probanden und bei Patienten mit akuter lymphoblastischer Leukämie vom common-Typ	66
4.3.4	Anzahl der "Cluster" bei hämatologisch Gesunden und bei Patienten mit akuter lymphoblastischer Leukämie vom common-Typ	68
4.4	Kultivierung von leukämischen Zell-Linien des non-T, non-B Typs in Diffusionskammern	70
5	MÖGLICHE RESERVOIRS FÜR DIE ENTWICKLUNG VON GRANULOZYTÄREN ZELLEN UND MAKROPHAGEN WÄHREND DER KULTIVIERUNG VON ZELLEN AKUTER LYMPHO- BLASTISCHER LEUKAMIEN VOM COMMON-TYP IN DIFFUSIONSKAMMERN	76
5.1	normale Resthämatopoese	77
5.2	Zellen der akuten lymphoblastischen Leukämie vom common-Typ	79
	LITERATURVERZEICHNIS	83
	DANKSAGUNG	
	LEBENS LAUF	

Zusammenfassung

Unter den Stimulationsbedingungen der Diffusionskammer (DC) entstanden bei Kultivierung mononukleärer Blutzellen von sieben Patienten mit akuter lymphoblastischer Leukämie vom common-Typ (cALL) nach einer Kulturdauer von 20 Tagen 60-80% granulozytäre Zellen und Makrophagen. Dagegen wurden bei Kultivierung mononukleärer Blutzellen von vier hämatologisch Gesunden nach 20tägiger Kulturdauer maximal 40% granulozytäre Zellen und Makrophagen gefunden. Obwohl die Zellzahl bei Kultur mononukleärer Blutzellen von cALL-Patienten im Gegensatz zur Kultur normaler Zellen über die gesamte Kulturperiode abnahm, war die Menge an granulopoetischen Zellen zu Tag 20 der Kulturperiode bei den cALL gegenüber Gesunden erhöht. Die zu Tag 20 entstandene Granulopoese war unabhängig von der Anzahl der eingesäten hämatopoetischen Vorläuferzellen, den granulopoetisch determinierten "colony-forming units in culture" (CFU-C) und den unreiferen "colony-forming units in DC" (CFU-DG). Bei der Klonierung mononukleärer Blutzellen mit der CFU-DG-Methode stimmte die Anzahl der CFU-DG bei den cALL-Patienten mit der Anzahl der CFU-DG bei Gesunden überein. Dagegen war die Zahl der aus 10-20 Zellen bestehenden "Cluster" bei den cALL-Patienten gegenüber den hämatologisch Gesunden erhöht. Bei diesen "cluster"-bildenden Zellen, von denen anzunehmen ist, daß sie das Reservoir für die entstandene Granulopoese darstellen, handelt es sich entweder um normale, durch die leukämischen Zellen supprimierte Stamm- oder Vorläuferzellen oder um cALL-Blasten mit der Fähigkeit in die granulozytäre Reihe zu differenzieren. Zur Prüfung der granulopoetischen Differenzierungskapazität der cALL-Blasten wurden die permanenten Zell-Linien Nalm-6M1 und Reh in DC kultiviert. Unter dem Einfluß der DC-Bedingungen exprimierten die Nalm-6M1-Zellen granulo- und monozytäre Oberflächenantigene. Die Reh- sowie die Nalm-6M1-Kulturzellen entwickelten eine positive Naphthol-AS-D-Chlorazetatesterase-Reaktion (ASDCL). Daraus läßt sich folgern, daß einige cALL-Blasten die Fähigkeit besitzen, granulozytäre Marker

auszuprägen. Jedoch bleibt offen, ob es sich dabei um eine normalen Vorläuferzellen entsprechende Fähigkeit oder um eine aberrante Programmierung der leukämischen Zellen handelt.

Bildverzeichnis

	Seite
Abbildungen:	
1 : Modell der Hämatopoese	4
2 : Experimentelles Design	40
3 : Wachstum von normalen mononukleären Blutzellen in DC: Abhängigkeit von der Zellsaat	43
4 : Wachstum von normalen mononukleären Blutzellen in DC: Einfluß von Füllzellen	44
5 : Wachstum von normalen mononukleären Blutzellen in DC: Einfluß der Einfrierprozedur	45
6 : Wachstum von mononukleären Blutzellen in DC: Vergleich zwischen cALL und hämatologisch Gesunden	46
7 : Morphologie der Zellen bei Patient T.H.	
a) zu Kulturbeginn	47
b) nach 20 Tagen DC-Kultivierung	48
8 : DC-Kultur mononukleärer Blutzellen von cALL-Patienten: Beziehung zwischen der Anzahl der leukämischen Blasten und der granulopoetischen Differenzierung	49
9 : Granulopoetische Differenzierung mononukleärer Blutzellen von Patienten mit cALL nach 20 Tagen DC-Kultivierung	50
10 : Granulopoetische Differenzierung mononukleärer Blutzellen in DC: Vergleich zwischen cALL-Patienten und hämatologisch Gesunden in prozentualer Darstellung	51
11 : Granulopoetische Differenzierung mononukleärer Blutzellen in DC nach 20 Tagen DC-Kultivierung: Vergleich zwischen cALL-Patienten und hämatologisch Gesunden in Absolutzahlen	52

12	: Granulopoetische Differenzierung mononukleärer Blutzellen in DC nach 20 Tagen DC-Kultivierung: Vergleich zwischen cALL-Patienten und hämatologisch Gesunden in Beziehung zur Zelleinsaat zu Kulturbeginn	54
13	: Granulopoetische Differenzierung mononukleärer Blutzellen von Patienten mit cALL in DC: Beziehung zwischen granulopoetischer Differenzierung und Anzahl der CFU-C zu Kulturbeginn	55
14	: Granulopoetische Differenzierung mononukleärer Blutzellen von hämatologisch Gesunden in DC: Beziehung zwischen granulopoetischer Differenzierung und Anzahl der CFU-C zu Kulturbeginn	56
15	: Granulopoetische Differenzierung mononukleärer Blutzellen in DC: Vergleich zwischen cALL-Patienten und hämatologisch Gesunden bei gleicher CFU-C-Einsaat zu Kulturbeginn	57
16	: Granulopoetische Differenzierung mononukleärer Blutzellen von Patienten mit cALL nach 20 Tagen DC-Kultivierung: Einfluß von Füllzellen	58
17	: Granulopoetische Differenzierung mononukleärer Blutzellen von hämatologisch Gesunden nach 20 Tagen DC-Kultivierung: Einfluß von Füllzellen	59
18	: Granulopoetische Differenzierung mononukleärer Blutzellen am Tag 20 in DC nach Verbesserung des Wachstums mit Füllzellen: Vergleich zwischen cALL-Patienten und hämatologisch Gesunden	60
19	: Größenverteilung granulopoetischer Zellaggregate am Tag 14 der DC-Kultur	62
20	: Morphologie granulozytärer Aggregate am Tag 14 der DC-Kultur	65
21	: Kultivierung mononukleärer Blutzellen in DC: Bestimmung der Anzahl der CFU-DG bei	
	a) hämatologisch Gesunden und	67
	b) Patienten mit cALL	67

22	: Kultivierung mononukleärer Blutzellen in DC: Bestimmung der Anzahl der "Cluster" bestehend aus	
	a) 10-15 Zellen/Aggregat	69
	b) 15-20 Zellen/Aggregat	69
23	: Kultivierung von Walm-6M1-Zellen in DC: Verhältnis der Gesamtzellzahl pro DC zur Anzahl der Zellen pro DC, welche das	
	1) B-Lymphozyten-assoziierte Antigen,	
	2) cALLA,	
	3) Granulozyten-spezifische Antigen oder das	
	4) Monozyten/Makrophagen-spezifische Antigen ausprägen.	71
24	: Kultivierung von Walm-6M1-Zellen in DC: ASDCL-Reaktion	
	a) am Tag 0	73
	b) am Tag 27	73
25	: Kultivierung von Walm-6M1-Zellen in DC: Zellmorphologie	
	a) am Tag 0	74
	b) am Tag 27	74

Tabellen :

1	: Immunologische Klassifizierung der ALL	15
2	: Monoklonale Antikörper	36
3	: Differentialblutbild des Patienten T.H. am Tag 20 der DC-Kultur	49
4	: Kultivierung von Walm-6M1-Zellen in DC: Verhältnis der Gesamtzellzahl pro DC zur Anzahl ASDCL-positiver Zellen und zur Anzahl der Zellen, die das Granulozyten-spezifische oder Monozyten-spezifische Antigen ausprägen	72

Abkürzungsverzeichnis

ALL	akute lymphoblastische Leukämie
ANLL	akute nicht-lymphoblastische Leukämie
cALL	ALL vom common-Typ
cALLA	common-ALL-Antigen
AcALLG	Anti-cALL-Globulin
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DC	Diffusionskammer
ADC	Agar-Diffusionskammer
FDC	Fibrinoclot-Diffusionskammer
PCDC	Plasmaclot-Diffusionskammer
DDC	Doppel-Diffusionskammer
T-Zelle	thymusabhängiger Lymphozyt
B-Zelle	bursa-äquivalenter Lymphozyt
prä-B-Lymphozyt	unreife B-Zelle
Ig	Immunglobulin
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
Mig	Membran-Immunglobulin
zIg	zytoplasmatisches Immunglobulin
E _s -Rezeptor	Rezeptor für Schafserythrozyten
TdT	Terminale desoxynucleotidyl-Transferase
AML	akute myeloblastäre Leukämie
CML	chronisch myeloische Leukämie
Ph ¹ -Chromosom	Philadelphia-Chromosom
CFC	Kolonie-bildende Zelle (Synonym: Kolonie-bildende Einheit)
CFU-C	Kolonie-bildende Einheit in der Kultur (Synonym: GM-CFC) für granulozytäre Zellen und Makrophagen
BFU-E	"Burst-forming"-Einheit erythrozytärer Zellen in der In-vitro-Kultur
CFU-E	Erythrozyten-Kolonie-bildende Einheit in der In-vitro-Kultur

Meg-CFC	Megakaryozyten-Kolonie-bildende Zelle in der In-vitro-Kultur
CFU-S	Kolonie-bildende Einheiten in der Milz
GEMM-CFC	Eine aus Granulozyten, Erythro- zyten, Megakaryozyten und Makrophagen bestehende Kolonie-bildende Zelle in der In-vitro-Kultur
GELMM-CFC	Eine aus Granulozyten, Erythro- zyten, Megakaryozyten, Makrophagen und Lymphozyten bestehende Kolonie- bildende Zelle in der In-vitro-Kultur
CFC-mix	Gemischte Kolonie-bildende Zelle in der In-vitro-Kultur (Die Kolonien bestehen aus granulozytären, erythrozytären, eosinophilen, mega- karyozytären und basophilen Zellen, B-Zellen, Makrophagen und CFC einschl. CFC-mix)
Eo-Baso-CFC	Eosinophile- und Basophile-Granulo- zyten-Kolonie-bildende Zelle in der In-vitro-Kultur
Eo-CFC	Eosinophile-Granulozyten-Kolonie-bildende Zelle in der In-vitro-Kultur
Baso-CFC	Basophile-Granulozyten-Kolonie-bildende Zelle in der In-vitro-Kultur
BT-CFC	B-Lymphozyten-Kolonie-bildende Zelle in der In-vitro-Kultur
TL-CFC	T-Lymphozyten-Kolonie-bildende Zelle in der In-vitro-Kultur
S-cells	Blastenkolonie-bildende Zelle
CFU-d	Kolonie-bildende Einheit in DC
CFU-DG	Granulozytäre-Kolonie-bildende Einheit in DC
CFU-DM	Megakaryozyten-Kolonie-bildende Einheit in DC

CFU-DEo	Eosinophile-Granulozyten-Kolonie-bildende Einheit in DC
CSA	Kolonie-stimulierende Aktivität (Synonym: CSF-GM)
Multi-CSF	GEMM-CFC-stimulierender Faktor
HIM	hämatoopoetisches Stroma
NAS	Naphthol-AS-Azetat-Esterase
ASDCL	Naphthol-AS-D-Chlorazetat-Esterase
G-6-PD	Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase
DMSO	Dimethylsulfoxid
Ara-C	Cytarabin
NCS	newborn calf serum (Serum von neu- geborenen Kälbern)
FKS	fötales Kälberserum
PAP-Methode	Peroxidase-Antiperoxidase-Methode
NaF	Natriumfluorid
PBS	phosphate buffered saline (phosphat- gepufferte, isotone Kochsalzlösung)
FITC	Fluoreszein-Isothiozyanat



1 Differenzierungskapazität von Zellen akuter Leukämien

Akute Leukämien sind charakterisiert durch das Auftreten unreifer Blasten im Blut und Knochenmark und dem damit verbundenen Fehlen reifer funktionsfähiger Zellen. Untersuchungen der Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G-6-PD)-Isoenzyme (30) und klonaler Marker (330) bei der akuten nicht-lymphozytären Leukämie (ANLL) (117, 115, 119), chronisch myeloischen Leukämie (CML) (266, 116, 120, 117, 27, 119, 14, 13, 236) und akuten lymphoblastischen Leukämie (ALL) (103) zeigten, daß der Ursprung von Leukämien in der malignen Transformation und nachfolgenden klonalen Expansion von hämopoetischen Vorläuferzellen, in manchen Fällen von pluripotenten Stammzellen liegt. Durch eine Entkoppelung der Proliferation von der Differenzierung bei den akuten Leukämien (150, 144, 374) kommt es dabei zu einer Stabilisierung des Vorläuferzellphänotyps, d. h. zu einem Differenzierungsstopp (150, 145). Analog den Entwicklungsstufen normaler B- und T-Lymphozyten lassen sich die ALL weiter unterteilen. Die akute lymphoblastische Leukämie vom common-Typ (cALL) entspricht demzufolge wahrscheinlich einer bipotenten lymphatischen Vorläuferzelle des B- oder T-Zellkompartiments (252).

Das Ziel konventioneller Chemotherapie von akuten Leukämien liegt in der Zerstörung der malignen Zellpopulation durch zytostatische Substanzen und der Repopulierung des Knochenmarks durch normale hämopoetische Zellen (Resthämatopoese). Ein anderer, noch wenig erforschter Ansatz ist, die leukämischen Zellen zur Ausreifung zu induzieren. Mehrere Substanzen können in vitro leukämische Zell-Linien zur Differenzierung bringen (261, 376, 381, 375). Agentien dieser Art sind Dexamethason, Lipopolysaccharide, Dimethylsulfoxid (DMSO), Actinomycin D und Cytarabin (Ara-C). Einige davon, beispielsweise Ara-C, werden bei der konventionellen Chemotherapie in hohen Dosen mit zytotoxischer Wirkung eingesetzt. Bei einzelnen Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (AML) (177, 10, 70, 73, 183, 292, 182, 423, 216),

refraktärer Anämie mit Blastenüberschuß (70, 216) und ALL (70, 216) konnte auch mit geringen Dosen, die in vitro eine Differenzierung leukämischer Zellen bewirken, eine vollständige oder teilweise Remission erreicht werden. Untersuchungen über den Ursprung reifer Granulozyten bei Patienten mit ANLL zeigten (114, 362), daß zumindest bei einigen Patienten die polymorphkernigen Granulozyten aus dem leukämischen Klon abstammten. Auerstäbchen in segmentkernigen Granulozyten, als Hinweis für eine leukämische Abstammung dieser Zellen, wurden vereinzelt beobachtet (91). Über die Differenzierungskapazität der cALL in vivo ist bisher wenig bekannt. Lau et al. (252) konnten zeigen, daß cALL-Blasten unter veränderten Umgebungsbedingungen zur Differenzierung entlang der B- und T-Zellreihe fähig sind.

In vielen Aspekten, in der Morphologie und dem zellulären Phänotyp (29, 207, 211, 212) sowie der therapeutischen Ansprechbarkeit auf Vincristin und Prednison (66, 71, 36), ähneln sich cALL und die zu 30% bei der CML vorkommende lymphoide Blastenkrise (213, 71, 33, 32, 237). Bei der CML findet die maligne Transformation einer pluripotenten Stammzelle statt, aus der Thrombozyten, Erythrozyten, myeloische Zellen sowie Lymphozyten entstehen (116, 266, 178, 5). Würde bei beiden Erkrankungen die gleiche Zielzelle von dem leukämischen Ereignis betroffen sein, wäre denkbar, daß die cALL granulozytäre Differenzierungspotenz besitzt.

Als geeignetes System zur Untersuchung der Frage, ob eine Ausreifung der Leukämiezellen allgemein möglich ist und auf welche Kompartimente sie sich erstreckt, hat sich die Diffusionskammer(DC)-Methode erwiesen. Die DC-Technik wurde für hämatopoetische Zellen von Benestad et al. (22) und Böyum und Bergström (38) entwickelt. Eine Anpassung für menschliche Zellen erfolgte durch Böyum et al. (47) und Cronkite et al. (132). Mit der DC-Kultivierung kann die Proliferation und Differenzierung pluripotenter hämatopoetischer Stammzellen, nämlich den "colony-forming unit-spleen" (CFU-S)

(53, 384, 412, 35) bei der Maus und den "granulocyte erythrocyte macrophage megakaryocyte colony-forming cell" (GEMM-CFC) (132) beim Menschen, sowie determinierter Vorläuferzellen, "burst-forming unit-erythrocyte" (BFU-E) (132), "granulocytic colony-forming unit in diffusion chambers" (CFU-DG) (199, 392, 198, 197, 196, 319, 202, 200, 329) und "granulocyte macrophage colony-forming cell" (GM-CFC) (132) bestimmt werden. Bisherige Untersuchungen zeigten, daß auch maligne Zellen in dem DC-System wachsen und differenzieren können (181, 123, 178, 86). Bei Kultivierung peripherer Blutzellen von Patienten mit akuten myeloischen Leukämien in DC wurde durch Analyse von Chromosomenmarkern (179) und durch das Auffinden von Auerstäbchen (34) nachgewiesen, daß zumindest ein Teil der entstandenen granulopoetischen Zellen aus den leukämischen Blasten hervorgegangen sein mußten. Lau et al. fanden Differenzierung in Zellen mit Eigenschaften von T- und B-Lymphozyten bei Kultivierung mononukleärer Blutzellen von Patienten mit cALL (253, 254, 403, 206). Daneben wurde dabei auch das Auftreten granulozytärer Zellen beobachtet (252, 178, 179, 86).

Folgende Fragestellungen wurden in der vorliegenden Arbeit unter Anwendung der DC-Kulturmethode untersucht:

1. Inwieweit steht das Ausmaß der granulopoetischen Differenzierung in DC von mononukleären Blutzellen von Patienten mit cALL sowie von hämatologisch Gesunden in direkter Beziehung zu dem Gehalt an granulopoetisch determinierten Vorläuferzellen?
2. Besitzen cALL-Blasten neben der Ausprägung von B- und T-Differenzierungsmarkern auch die Fähigkeit, in DC in die granulozytäre Reihe zu differenzieren?

2 Grundlagen

2.1 Hämatopoese

Die Nachbildung der reifen, kurzlebigen Blutzellen erfolgt aus hämatopoetischen Stammzellen über eine Reihe verschiedener Differenzierungsschritte (Abbildung 1).

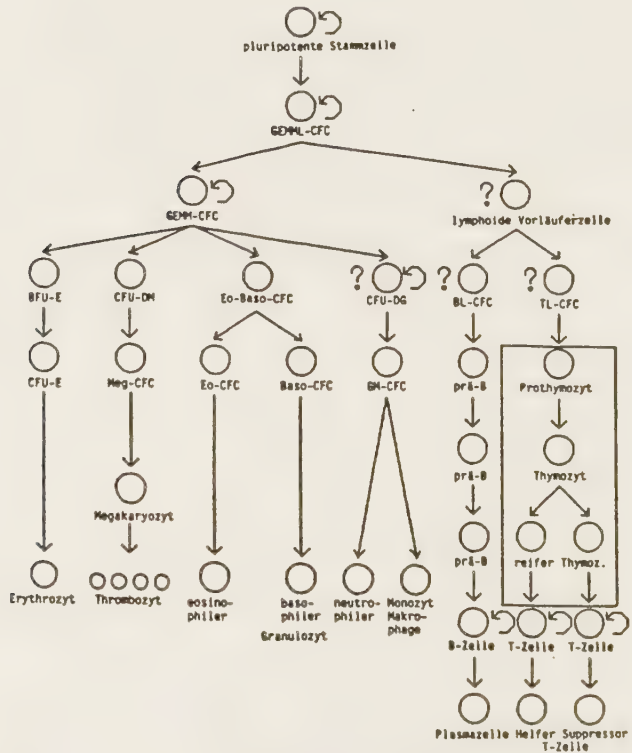


Abbildung 1 Modell der Hämatopoese

? angenommene Position der Zelle im
hämatopoetischen Stammbaum

↻ Selbsterneuerungskapazität

Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis

Das hämatopoetische System läßt sich in vier Kompartimente unterteilen: Das erste Kompartiment bilden die pluripotenten Stammzellen mit der Fähigkeit, sich selbst zu erneuern. Sie haben eine große Proliferationskapazität und können alle differenzierten hämatopoetischen Zellen produzieren. Durch diese Eigenschaften sichern sie den Fortbestand des Systems. Aus ihnen entstehen die zur Differenzierung bestimmten hämatopoetischen Vorläuferzellen mit eingeschränkter Selbsterneuerungskapazität, das zweite Kompartiment. Die pluripotenten Stammzellen wie auch die Vorläuferzellen können nur durch funktionelle Untersuchungen nachgewiesen werden. Das dritte Kompartiment besteht aus den morphologisch erkennbaren differenzierenden Zellen. Sie können nur noch in eine der hämatopoetischen Zell-Linien ausreifen, und ihre Fähigkeit zur Zellteilung ist begrenzt. Die reifen, mit Ausnahme der Lymphozyten nicht mehr teilungsfähigen Blutzellen, das vierte Kompartiment, erfüllen ihre speziellen Funktionen. Verlust und Nachbildung an reifen Blutzellen stehen durch die auf Stamm- und Vorläuferzellen wirkenden Regulationsmechanismen im Gleichgewicht.

Pluripotente Stammzellen wurden erstmals von Till und McCulloch (406, 404) mit dem "spleen colony assay" gefunden und quantifiziert. Einige Zellen aus dem Knochenmark oder der Milz bilden, wenn sie in letal bestrahlte, syngeneische Mäuse injiziert werden, makroskopisch sichtbare Knoten. Die Arbeitsgruppe um Till und McCulloch konnte zeigen, daß jeder Knoten eine Kolonie war, die aus einer Zelle, der "colony-forming unit-spleen" (CFU-S), abstammte (16, 433). Jede Kolonie enthielt alle Arten von myeloischen Zellen sowie weitere CFU-S (385). Durch andere Untersuchungen im Mäusesystem mit durch ionisierende Strahlen induzierten Chromosomenmarkern wurde eine gemeinsame Stammzelle für myeloische und B-lymphozytäre Zellen (432, 251, 410) gefunden. Nachkommen einer einzelnen Stammzelle können die Myelo- und Lymphopoese letal bestrahlter Mäuse restituieren (287, 1, 345). Daraus läßt sich folgern, daß eine gemeinsame Stammzelle für

myeloische als auch lymphozytäre Zellen existiert. Hodgson und Bradley (169) beobachteten, daß nur ein Teil der CFU-S die Fähigkeit zur Repopulierung einer bestrahlten Maus besitzt. Die Existenz zweier Untergruppen von CFU-S wurde durch fluoreszenz-aktivierte Zelltrennung bestätigt. CFU-S-I können letal bestrahlte Empfängertiere repopulieren, besitzen eine hohe Selbsterneuerungs- und Proliferationskapazität sowie eine mittlere Bindungsfähigkeit für fluoreszierendes Pokeweed-Mitogen und bilden zum Tag 14 große Milzkolonien. Die stark fluoreszierenden CFU-S-II bilden kleine Milzkolonien zum Tag 7 und haben eine geringe Selbsterneuerungs- und Proliferationsfähigkeit (263, 219, 282). Inwieweit das Mäusemodell auf den Menschen übertragen werden kann, ist noch nicht bekannt. Einen Hinweis auf die Existenz einer menschlichen CFU-S bieten die nach Knochenmarkstransplantationen gefundenen Milzkolonien (8).

Mit der erstmals von Bradley und Metcalf (50) und Pluznik und Sachs (348) entwickelten In-vitro-Kultur-Methode, bei der die Nachkommen einzelner Zellen als Klone oder Kolonien in semisolidem Agar beurteilt und gezählt werden können, wurden eine Reihe von hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen, "colony-forming cells" (CFC) gefunden und charakterisiert. Nakahata und Ogawa (303) und Keller und Phillips (227) beschrieben die Kultur kleiner Blastenkolonien, "stem cells" (S-cells), unter denen sich eine große Anzahl von CFU-S, "mixed colony-forming cells" (CFC-mix) und andere CFC befanden. CFC-mix (222, 278) bilden Kolonien, die Zellen der erythrozytären, granulozytären bzw. monozytären, eosinophilen, megakaryozytären, basophilen (379) und B-lymphozytären (162) Reihe sowie CFU-S-II, weitere CFC-mix und andere CFC (186, 219, 278) enthalten können. Die genaue Beziehung zwischen den S-cells, den CFC und den CFU-S in der hämatopoetischen Hierarchie ist noch nicht geklärt. Wegen der Häufigkeit der CFC-mix und ihren Eigenschaften scheint es wahrscheinlich, daß es sich um die gleiche Population wie

die CFU-S-II handelt. Die unreiferen S-cells entsprechen möglicherweise den CFU-S-I.

Mit der oben genannten Agar-Klonierungs-Methode konnten auch menschliche, Blastenkolonien-bildende Stammzellen (S-cells, 301) sowie myelo-lymphopoetische pluripotente Stammzellen "granulocyte erythrocyte lymphocyte megakaryocyte macrophage colony-forming cells" (GELMM-CFC) beobachtet werden (107). Unter den erstmals von Fauser und Messner (109, 110) beschriebenen "granulocyte erythrocyte megakaryocyte macrophage colony-forming cells" (CFC-GEMM) wurden T-Lymphozyten verschiedener Phänotypen durch monoklonale Anti-T-Zell-Antikörper (112, 108, 275, 244) wie auch B- und prä-B-Lymphozyten identifiziert (111, 113). Denburg et al. (94) gelang der Nachweis des klonalen Ursprungs basophiler Granulozyten aus den CFU-GEMM. Durch Untersuchungen zur Linearität und Sedimentierungsgeschwindigkeit (109), Ko-Kultivierungsexperimente (109), Analyse der G-6-PD von gemischten Kolonien (256, 350), Reklonierungsexperimente zur Bestimmung der Kapazität zur Selbsterneuerung (277, 276) und durch den direkten Beweis (300) wurde der Ursprung gemischter Kolonien aus einer einzelnen Zelle gezeigt. Weitere Hinweise für die Existenz einer gemeinsamen myeloischen und lymphoiden Stammzelle ergeben sich aus Untersuchungen des G-6-PD-Enzyms bei hämatologischen Erkrankungen (117, 351, 266, 116, 120, 118, 204, 2).

Die hämatopoetischen Vorläuferzellen, die direkten Nachkommen der Stammzellen, repräsentieren ein Kontinuum von Differenzierungsstufen. Sie sind in der Regel zur Differenzierung in eine hämatopoetische Zell-Linie bestimmt. Es wurden jedoch auch Unterpopulationen von bi- oder tripotenten Vorläuferzellen (346, 50, 95, 304, 273, 217) gefunden. Die Vorläuferzellen unterscheiden sich von den Stammzellen durch ihre begrenzte Fähigkeit zur Selbsterneuerung, unterschiedliche Größe (431, 430, 397), Dichte (294, 163) und Oberflächenantigene (415, 314), ihre hohe Proliferationsrate

und ihre Empfindlichkeit gegenüber ionisierenden Strahlen und zytotoxischen Substanzen in vivo (249, 192). Für jede der hämatopoetischen Reihen wurden Vorläuferzellen gefunden. "Granulocyte-macrophage colony-forming cells" (GM-CFC) der Maus (50, 191) und des Menschen (346) bilden Kolonien aus granulozytären Zellen und Makrophagen. Menschliche GM-CFC exprimieren ein B-lymphozytäres Antigen (225). Dies spricht für eine enge Beziehung beider Zell-Linien. Die GM-CFC ist wahrscheinlich die Tochterzelle der "granulocytic colony forming-unit in DC" (CFU-DG, 202), aus der in DC granulozytäre Kolonien entstehen. Die Stellung der CFU-DG im hämatopoetischen Stammbaum ist noch nicht eindeutig geklärt. Obwohl bei der CFU-DG nur granulozytäre Kolonien gefunden werden, ist nicht auszuschließen, daß es sich bei der CFU-DG um eine multipotente Vorläuferzelle handelt, da aus ihr auch CFU-S hervorgehen können (328). Für die erythrozytäre Reihe gibt es zwei In-vitro-Vorläuferzellen, die unreiferen "burst-forming unit-erythrocyte" (BFU-E, 9 bei Mäusen) und die reiferen "colony-forming unit-erythrocyte" (CFU-E, 396 bei Mäusen, 400 bei Menschen). Beide Kolonietypen können auch mit der DC-Methode kultiviert werden (392, 85, 19). Die eosinophile und basophile Reihe besitzen eine gemeinsame (95) sowie eine auf die eosinophile (221 bei Mäusen, 74 bei Menschen) und basophile (379 bei Mäusen, 268 bei Menschen) Reihe begrenzte Vorläuferzelle. Die "megakaryocyte colony-forming cell" (Meg-CFC, 281 bei Mäusen, 414 bei Menschen) und die "megakaryocyte colony-forming unit in DC" (CFU-DM, 340) bilden megakaryozytäre Kolonien in Agar bzw. in der DC. Die Existenz einer gemeinsamen lymphozytären Vorläuferzelle für B- und T-Lymphozyten ist bislang hypothetisch und wird nur durch geringe Hinweise (224, 80) gestützt. Für klonales Wachstum von B-Lymphozyten (279 bei Mäusen, 194 bei Menschen) und T-Lymphozyten (372 bei Mäusen, 371 bei Menschen) wurden Techniken beschrieben. Es erscheint jedoch wahrscheinlich, daß diese Klone-bildenden Zellen bereits reifer als Vorläuferzellen sind. Reife Lymphozyten unterscheiden sich von reifen myeloischen Blutzellen durch ihre Langlebigkeit

und Selbsterneuerungsfähigkeit bei einer Immunantwort. Diese Gedächtnis-B- und T-Lymphozyten sind zu starker Proliferation fähig. Das in Abbildung 1 dargestellte Modell der normalen lymphozytären Differenzierung basiert auf dem Konzept, daß der Phänotyp normaler lymphatischer Zellen verschiedener Differenzierungsstufen von dem Phänotyp seines malignen Gegenspielers hergeleitet werden kann. Die lymphozytären Differenzierungsstufen werden deshalb mit dem Abschnitt "Immunologische Charakterisierung akuter lymphoblastischer Leukämien" beschrieben.

Für den Mechanismus der Selbsterneuerung und Determinierung zur Differenzierung von Stamm- und Vorläuferzellen wurden verschiedene Modelle vorgeschlagen (405, 187, 302, 409, 88, 98, 417, 418, 239, 407, 245). Eine Theorie für die Stamm- und Vorläuferzelldifferenzierung ist, daß die Determinierung unabhängig von externen Faktoren (405, 187, 302, 239, 245) zufällig oder vorprogrammiert erfolgt. Eine zweite Theorie geht von einem entscheidenden Einfluß des Stromas der direkten Umgebung, des "hemopoietic inductive microenvironment" (HIM), auf die Stammzellen aus. Dabei werden die Zellen durch direkten Zell-zu-Zell-Kontakt oder durch Faktoren mit kurzer Reichweite (409, 88) reguliert. Als dritte Theorie gilt, daß Stamm- und Vorläuferzellen Rezeptoren für verschiedene Faktoren mit großer Reichweite, z. B. "colony stimulating factors" (CSF), besitzen. Die Bindung dieser Faktoren an die Rezeptoren stimuliert die Stamm- bzw. Vorläuferzelle zur Produktion von Nachkommen (417, 418, 407).

Durch zahlreiche In-vivo-Untersuchungen wurden in hämatopoetischen Geweben stimulierende sowie hemmende Substanzen, die zur Veränderung der Stammzellproliferation fähig sind, gefunden (129, 259, 260, 127). Es ist ungeklärt, ob diese Faktoren auch das Verhältnis der Selbsterneuerung zur Differenzierung beeinflussen. Einige dieser Faktoren können eine Determinierung der hämatopoetischen Stammzellen für bestimmte Zellreihen induzieren (161, 128).

Durch klonale In-vitro-Assays wurden mehrere, die Proliferation und Differenzierung hämatopoetischer Vorläuferzellen (283) stimulierende Faktoren, die CSFs, identifiziert. Beide Schritte, Determinierung zur Differenzierung sowie Selbsterneuerung, scheinen eine Zellteilung zu benötigen. Möglicherweise wird durch die Konzentration des Multi-CSFs, des auf Stammzellen wirkenden CFSs, die Relation von Selbsterneuerung zur Differenzierung beeinflusst (220).

Das Konzept der Stammzellregulierung durch das HIM wird durch zwei Beobachtungen gestützt, zum einen durch Untersuchungen mit mutanten Mäusen und zum anderen durch Langzeit-Knochenmark-Kultur von multipotenten Zellen. Knochenmark von mutanten Mäusen des Sl/Sl⁻-Typs können letal bestrahlte Mäuse repopulieren, jedoch nicht als Empfängertiere dienen (270, 373). W/W⁻ Mäuse können Milzkolonien bilden, wenn ihnen normale syngeneische Zellen transplantiert werden, aber sie können nicht als Spender verwendet werden (271). Langzeit-Knochenmark-Kulturen scheinen zum Wachstum und zur Differenzierung eine anhaftend wachsende Schicht aus Fibroblasten, Epithelzellen und Fettzellen zu benötigen (98, 158, 157, 154, 156). Diese Zellen werden von einer gemeinsamen Stammzelle für hämatopoetische Zellen und Knochenmark-Stromazellen gebildet (386, 226). Mit diesem System können alle myeloischen Vorläuferzellen kontinuierlich produziert werden, erythroide Differenzierung ist jedoch nur durch Zugabe von anämischen Mäuseplasma oder Erythropoietin zu erreichen (96, 97). Die lymphoide Differenzierung in diesem System ist minimal (224), möglicherweise bedingt durch das Fehlen spezifischer Faktoren oder von entsprechendem "micro-environment" (380). Zusätzlich zu den Stromazellen finden sich in diesem System die Stammzellproliferation hemmende und stimulierende Substanzen (100, 99).

Zusammengefaßt behandeln die oben genannten Modelle zur Regulierung der Hämatopoese unterschiedliche Teilaspekte, welche sich nicht gegenseitig widersprechen.

2.2 Immunologische Charakterisierung von akuten lymphoblastischen Leukämien

Die phänotypische Heterogenität der Leukämien steht in enger Beziehung zu den Differenzierungsstufen der normalen Hämatopoese. Die Entkopplung der Proliferation von der Differenzierung bei den akuten Leukämien (150, 144, 374) führt zur Stabilisierung des normalerweise vorübergehenden Vorläuferzellphänotyps, d. h. zu einem relativen Differenzierungsstopp (150, 145). Die leukämischen Zellpopulationen sind jedoch während des Wachstums noch zu einzelnen Differenzierungsschritten fähig (261). Dies bedeutet, daß der Phänotyp der gefundenen malignen Zellpopulationen nicht unbedingt mit dem Phänotyp der Zielzelle, bei der die Transformation stattfand, Übereinstimmen muß.

Akute lymphoblastische Leukämien (ALL) werden durch morphologische, zytochemische und immunologische Charakterisierung klassifiziert. Die auf der Morphologie basierende Diagnostik (26) hat sich für die prognostische Beurteilung als wertvoll erwiesen, jedoch kann durch sie allein die klinische und immunologische Heterogenität der ALL nicht erfaßt werden. Durch das Auffinden von Eigenschaften normaler B- und T-Lymphozyten auf den leukämischen Zellen konnten zwei Untergruppen der ALL abgegrenzt werden (54). Analog den immunkompetenten T-Lymphozyten exprimieren T-ALL T-Zell-Antigen (229, 401, 297, 41) und besitzen daneben teilweise zusätzlich Rezeptoren zur Rosettenbildung mit Schaf-Erythrozyten (E_e) (290, 55). Als B-ALL wird eine kleine Gruppe von ALLs bezeichnet, die wie ihre normalen Gegenspieler Membran-Immunglobulin (Mlg) ausprägen (131, 17).

Die nur durch Ausschluß dieser Marker charakterisierte non-T non-B ALL konnte durch das von Greaves et al. (151) und kurz darauf von Rodt et al. (367) entwickelte Antiserum gegen das "common"-ALL-Antigen (cALLA) weiter in die akute lymphoblastische Leukämie vom common-Typ (cALL) und die Null-ALL

unterteilt werden. cALLA ist ein nicht-phosphoriliertes Zelloberflächenglykoprotein mit einem Molekulargewicht von etwa 100 000 Dalton (312), gegen das auch monoklonale Antikörper, J 5 (364) und Vil-A 1 (233), produziert wurden. Etwa 80% der ALL prägen das cALLA aus (367, 141, 291, 365). Das cALLA wurde nicht nur bei ALL gefunden, sondern auch zu 30% bei Patienten mit CML in lymphoider Blastenkrise (141, 365), bei B- und T-Zell-Lymphomen (365, 363, 92) sowie in kleiner Anzahl auf lymphoiden Vorläuferzellen im normalen Knochenmark (172, 146, 171, 147, 93), Thymus (311) und peripheren Blut (336). Das cALLA ist wahrscheinlich einem lymphozytären Vorläuferstadium zuzuordnen (252). Jedoch wurde ein ähnliches, aber nicht identisches (269) cALLA-Molekül auch auf reifen Granulozyten (81, 52) und nicht-hämatopoetischen Geweben (285, 69, 342, 399, 347) beobachtet, dessen Bedeutung noch nicht geklärt ist.

P24/BA-2 ist ein zweites Leukämie-assoziiertes Antigen und findet sich, ähnlich dem cALLA, auf den meisten non-T, non-B ALL. Das Antigen mit einem Molekulargewicht von 24 000 Dalton reagiert mit den monoklonalen Antikörpern BA-2 (228), SJ-9A4 (238) und DU-ALL-1 (223).

Mehr als 90% der cALLA-positiven leukämischen Zellen enthalten einen hohen Gehalt an terminaler desoxynukleotidyl-Transferase (TdT) (267, 170). Das erstmals von Bollum (38) beschriebene Enzym katalysiert die Polymerisation von Desoxyribonukleosid-Monophosphaten ohne Benutzung eines Templates. TdT wurde in hohen Konzentrationen bei normalen Zellen nur in Thymozyten und zu einem kleinen Teil in Knochenmarkszellen, nicht jedoch in reifen Lymphozyten gefunden (79, 377, 208). Es wird als Hinweis auf eine Determinierung in die lymphozytäre Reihe aufgefaßt (209, 145, 208, 267, 40, 190, 377, 39). Die Mehrzahl der AML sind TdT-negativ. TdT wird deshalb zusammen mit anderen Markern zur Differenzierung zwischen AML und ALL eingesetzt (170, 104, 51). Jedoch kommen in etwa 10% aller Fälle mit AML TdT-positive Blasten

vor (51, 89, 28, 413). Möglicherweise stellen die TdT-positiven Blasten bei der AML ein Beispiel aberranter Genexpression dar (214), oder es handelt sich dabei um biphenotypische Leukämien. Daneben wurde in Erwägung gezogen, daß TdT auch in Stammzellen und frühen hämatopoetischen Vorläuferzellen vorhanden ist (89).

Fast alle cALL-positiven leukämischen Blasten tragen das HLA-DR- oder Ia-Antigen (378, 130). Die quantitative Expression des cALLA und des Ia-Antigens sind positiv korreliert (331). Das Ia-Antigen ist ein Glykoproteinkomplex aus zwei Polypeptidketten mit einem Molekulargewicht von 29 000 beziehungsweise 34 000 (388). Die zunächst durch Allo-Antisera auf B-Lymphozyten (426) gefundene Membranstruktur kommt auch auf myeloischen Vorläuferzellen (425, 210, 201, 428), Monozyten beziehungsweise Makrophagen (427) und zum Teil auf stimulierten T-Lymphozyten (359) vor. Ia-Antigen wird von den Non-T-ALL exprimiert (313, 230, 335), wogegen T-ALL weitgehend negativ für Ia-Antigen sind (313, 363, 335).

Vorläuferzellen von B-Lymphozyten, die prä-B-Zellen, enthalten die schwere, nicht jedoch die leichte Kette des Immunglobulins im Zytoplasma (zIg) (133). Sie prägen noch kein Membran-Immunglobulin aus. Unter den akuten lymphoblastischen Leukämien vom common-Typ fanden Vogler et al. (419) eine Gruppe von Leukämien, deren Zellen zytoplasmatisches Immunglobulin enthielten. Diese Gruppe wird als prä-B-ALL bezeichnet.

Die Entwicklung monoklonaler Antikörper gegen Zelloberflächen-Antigene und molekularer Proben zur Identifizierung von Immunglobulin- und T-Zellrezeptor-Genen führte zu einem entscheidenden Einblick in die verschiedenen Differenzierungsstufen normaler und maligner B- und T-Lymphozyten. Das Leben einer T-lymphozytären Zelle kann in 4 Phasen - prätymisch, thymisch, postthymisch unstimuliert und

postthymisch stimuliert - eingeteilt werden. Von der pluripotenten Stammzelle abstammende Vorläuferzellen wandern in den Thymus ein und differenzieren dort zu Thymozyten. Diese verlassen den Thymus und reifen zu immunkompetenten T-Lymphozyten, welche im Körper zirkulieren. Durch stimulierende Agentien treten sie in die funktionelle Phase ein. Als prä-T-ALL wurden von Foon et al. (124) Leukämien bezeichnet, die mit monoklonalen Anti-T-Antikörpern (Leu-1) reagierten, jedoch keine E_s-Rosetten formten. Das von Carrel et al. (68) definierte spezifische pan-T-Antigen (p40) scheint von frühen T-Zellen vor dem Erscheinen von Rezeptoren für E_s exprimiert zu werden. ALL, die das p40, jedoch keine der von Reinherz et al. (359) beschriebenen T-Zell-Marker oder Rezeptoren für Schaf-Erythrozyten ausprägen, wurden von Fliedner als "unreife T-ALL" eingeteilt (420). Eine beginnende T-Zelldifferenzierung bei ALL kann auch an der gleichzeitigen Ausprägung von cALLA und T-Zellantigen erkannt werden (402, 309). Mit Hilfe der monoklonalen OKT-Antikörper konnte die T-ALL von Reinherz et al. (360) entsprechend den Stadien der intrathymischen Differenzierung in Prothymozyten, Thymozyten und späte Thymozyten subklassifiziert werden. Die meisten T-ALL besitzen Antigene, die auf Prothymozyten gefunden werden. Ähnliche Ergebnisse wurden von Greaves et al. (148) erhalten. Roper et al. (368) untersuchten diese Unterteilung der T-ALL auf klinische Relevanz. Sie konnten jedoch weder besondere klinische Eigenschaften finden noch Unterschiede bezüglich Remissions- oder Überlebensdauer feststellen.

Immunglobuline werden durch unzusammenhängende Segmente der Desoxyribonukleinsäure (DNS) kodiert (184, 48, 240, 242, 168). In ihrer Entwicklung müssen die B-terminierten Zellen zur Produktion der Antikörperdiversität die für die variable und konstante Region eines Ig-Moleküls kodierenden Gene rearrangieren (255, 408). Dabei gehen Rearrangements schwerer Ketten denen leichter Ketten voraus (240, 242, 168). Rearrangements schwerer Ketten wurden auch in nicht-B-Zellen gefunden. Rearrangements leichter Ketten scheinen dagegen

nur bei den B-Zellen vorzukommen (242, 246, 231). Durch das Auffinden klonaler Rearrangements der Gene für leichte Ketten des Ig sowie B-Zell-assoziiierter Antigene bei den Non-T-ALL konnte gezeigt werden, daß die meisten der Non-T-ALL den Phänotyp einer frühen B-Vorläuferzelle ausprägen (240, 241, 298, 299).

Die beschriebenen Untergruppen der ALL unterscheiden sich in ihrer Prognose und benötigen verschiedene therapeutische Ansätze (420, 152, 143, 148). Daher ist die immunologische Unterteilung der ALL nicht nur von fundamentalem Interesse, sondern auch klinisch wichtig (152, 143, 148, 402).

Zusammengefaßt läßt sich die ALL in folgende Haupt-Untergruppen mit dem jeweiligen Phänotyp unterteilen:

	CALLA	IdT	HLA-DR	E ₉ -Rosetten	pan-T-Zellantigen	Mig	zlg
Null-ALL	-	+	+	-	-	-	-
Common-ALL	+	+	+	-	-	-	-
Prä-B-ALL	+	+	+	-	-	-	+
B-ALL	-	-	+	-	-	+	-
Prä-T-ALL	-/+	+	-	-	+	-	-
T-ALL	-	+	-	+	+	-	-

Tabelle 1 Immunologische Klassifizierung der ALL

mit Änderungen übernommen von Catovsky,
D. und Tavares de Castro, J. (72)

2.3 In-vivo-Kultivierung und -Klonierung von hämatoopoetischen Zellen in Diffusionskammern

Wesentliche Erkenntnisse über die Hämatopoese und ihre Regulation wurden aus In-vitro-Kulturen gewonnen (283, 64). Die Überprüfung ihrer physiologischen Relevanz in situ ist sehr komplex und schwierig (25). Eine Umgehung dieser Probleme kann durch die DC-Methode erreicht werden, da die DC zum einen ein nahezu physiologisches In-vivo-Milieu bietet und zum anderen die Zellen in einem geschlossenen System wachsen. Bei der DC-Technik werden die zu untersuchenden Zellen in kleinen Kammern mit semipermeablen, bakterien-dichten Membranen intraperitoneal in Versuchstieren kultiviert.

Die DC-Methode mit der Verwendung von Millipore-Membranen wurde erstmals von Algire, Weaver & Prehn (3) entwickelt und geht auf die In-vivo-Kultur von Zellen in Kollodiumsäckchen (361, 31) sowie von Bakterien in Seidensäckchen (284) zurück. Die heute verwendete Technik basiert auf der Modifizierung der DC-Methode durch Benestad (22). Zur Herstellung der DC werden auf einen Plexiglasring zwei aus Zelluloseverbindungen bestehende Membranen entweder mit einem untoxischen Klebstoff geklebt (22) oder durch Hitze mit einem speziell dafür angefertigten Apparat aufgeschmolzen (23). Die dabei verwendeten Membranen mit einer Porengröße von $0,22\ \mu\text{m}$ lassen freien Stoffaustausch zu (306, 248, 21) und sind für Zellen undurchlässig (422, 4). Im Verlauf der Kultur bildet sich auf den DC-Membranen eine Schicht aus Fibrin und Peritonealzellen, die die Diffusion von nutritiven Substanzen bei einer Kultur von mehr als einer Woche beeinträchtigt. Eine Verlängerung der Kulturdauer kann durch Entnahme der DC mit anschließender Reinigung ihrer Außenseiten und erneuter Implantation erreicht werden. Die dadurch verursachte Unterbrechung der In-vivo-Kultur hat bei weniger als sechs Stunden Dauer keine Schädigung der Kulturzellen zur Folge (306, 23). Innerhalb der DC entsteht bei der Kultivierung ein Gerinnsel aus Fibrin, in dem die Zellen eingebettet

wachsen (7). Zur Ernte von Einzelzellsuspensionen muß dieses Gerinnsel aufgelöst werden. Nachdem anfängliche Versuche mit Streptokinase und Trypsin (7, 67) scheiterten, wurde durch die Verwendung des proteolytischen Enzyms Pronase eine Lösung des Problems erreicht (306).

Die DC-Methode eignet sich vor allem zur Untersuchung der Proliferation und Differenzierung hämatopoetischer Zellen des Knochenmarks (35, 45) sowie des peripheren Blutes (35, 22). In der DC werden Zellen sämtlicher hämatopoetischer Linien, der granulozytären-Makrophagen (22, 24), eosinophilen (272, 24), erythrozytären (160, 421), thrombozytären (35, 340) und lymphozytären (252, 247, 76, 67, 86) gebildet, wobei das System die granulo-monozytäre Reihe bevorzugt (22, 24). DC-Langzeitkulturen (265) stellen ein gutes Modell für normale "steady-state" Granulopoese dar. Bei Kultur von Mäusenochenmark wurden nach anfänglichem Wachstum gleichbleibende Zahlen von CFU-S, CFU-C und reifenden Granulozyten gefunden, deren Relation zueinander auf ein System der Wachstumsvervielfältigung schließen läßt (384). Dieser Befund und der Nachweis der Proliferation von CFU-S (53, 384, 412) und CFU-C (356) in DC zeigen die Beteiligung beider Vorläuferzellen an der Bildung der Zellen in DC. Eine Anpassung der DC-Methode für die Kultur menschlicher Zellen erfolgte durch Böyum et al. (47) und Cronkite et al. (84). Wie im Mäusesystem findet in den DC Proliferation und Differenzierung von menschlichen, determinierten Vorläuferzellen, den CFU-C (175, 132), den CFU-DG (197) und den BFU-E (132), statt. Neben indirekten Nachweisen (175, 15), daß menschliche pluripotente Vorläuferzellen in DC wachsen, wurde von Ganser und Hoelzer (132) die Proliferation von GEMM-CFC in DC beobachtet.

Durch Fixierung der Zellen in semisoliden Medien, in Agar (139) oder in einem Fibringerüst (199, 392), können mit der DC-Methode hämatopoetische Zellen kloniert werden. Bei der Agar-Diffusionskammer (ADC)-Technik wird, ähnlich den

In-vitro-Agar-Kulturen, eine Agar-Zellsuspension in die DC eingefüllt. Zur Herstellung des Fibringerüstes kann man entweder die Zellsuspension mit Rinder-Citratplasma und Rinder-Embryoxtrakt mischen (Plasmaclot-Diffusionskammer-Methode (PCDC, 392)) oder eine bereits in die DC eingegebene Zell-Fibrinogenlösung durch Thrombin zur Gerinnung bringen (Fibrinclot-Diffusionskammer-Methode (FDC, 199)). Die Bestimmung der Kolonien an den jeweiligen Erntetagen kann durch mikroskopische Untersuchung des nativen (139) oder des dehydrierten und fixierten DC-Inhaltes (19, 392) erfolgen. Eine weitere Möglichkeit bietet die zentrifugale Erntetechnik, bei der die Zellen unter Auflösung des Fibringerüstes durch Pronase auf Objektträger zentrifugiert werden (199). Die mit den beiden Techniken, ADC und FDC, erfaßten Vorläuferzellen sind aufgrund verschiedener Erntetage, für menschliche Zellen Tag 9 bei der ADC (137) und Tag 14 bei der FDC bzw. PCDC (199, 392), schwer zu vergleichen. Die mit der ADC-Methode entdeckte granulozytäre Vorläuferzelle scheint in enger Beziehung zur CFU-C zu stehen (139, 136, 137). Mit der FDC-Methode wurden bei Kultur menschlicher Knochenmarkszellen granulozytäre, eosinophile, megakaryozytäre, fibroblastenähnliche und selten lymphoide Zellaggregate gefunden (199, 198, 196, 352), wobei die granulozytären Aggregate im Vordergrund standen. Bei der Kultivierung von hämatopoetischen Mäusezellen (392, 394, 85) in PCDC entstanden "bursts"- und Kolonien-formende erythrozytäre und granulozytäre Aggregate. Aufgrund ihrer Eigenschaft, in FDC-Kultur Kolonien zu bilden, wurden diese Vorläuferzellen "colony-forming unit in diffusion chamber" (CFU-d) genannt. Ihr klonaler Ursprung wurde mit Chromosomenmarkern nachgewiesen (328). Die "granulocytic colony-forming unit in diffusion chamber" (CFU-DG), "eosinophilic colony-forming unit in diffusion chamber" (CFU-DEo) und "megakaryocyte colony-forming unit in diffusion chamber" (CFU-DM) exprimieren das DR-Antigen (235, 201), welches auch auf den In-vitro-"colony forming cells" (CFC) (428, 425, 378), nicht jedoch auf reifen Endzellen (428, 425, 378) gefunden wurde.

Im Gegensatz zu CFU-C befindet sich nur ein kleiner Teil der CFU-DG in S-Phase (317, 322). Die CFU-DG und CFU-DM scheinen empfindlicher auf Einfrierprozeduren (326, 320) und hypotone Lysis (325) zu reagieren. Kinetische Untersuchungen von Jacobsen (202, 200) und Niskanen et al. (329) sowie unterschiedliche Wachstums-Charakteristiken (329) lassen annehmen, daß die CFU-DG eine jüngerere Vorläuferzelle ist als die CFU-C. Die Beziehung zwischen pluripotenten Vorläuferzellen und der CFU-DG ist nicht eindeutig geklärt. Die Sedimentationsprofile für CFU-DG und CFC-mix überlappen sich, wogegen CFU-C abgetrennt werden können (324). Bezüglich der Dichte (317), der Zellkinetik (317, 322) und der Empfindlichkeit gegenüber hypotoner Lyse (325, 394) sind die CFU-DG und die CFU-S weitgehend gleich. Unterschiede wurden dagegen in der Reaktion auf Hyperthermie (105), Einfrierprozeduren (326) und Hydroxyurea (20) beobachtet. Die Analyse einzelner CFU-DG-Kolonien durch Subkultur zeigte das Vorhandensein von CFU-mix und CFU-S (328). Aufgrund dieser Beobachtungen ist es möglich, daß die CFU-DG eine sehr junge Vorläuferzelle darstellt und nur durch die Kulturbedingungen auf die Differenzierung in die granulozytäre Reihe beschränkt ist. Im hämatopoetischen Stammbaum wird sie bisher zwischen der CFU-C und der pluripotenten Stammzelle als granulozytäre Vorläuferzelle eingeordnet.

Die Regulation der CFU-DG scheint außer durch "granulocyte-macrophage colony-stimulating activity" (GM-CSA, 383), welche in vitro granulozytäre Vorläuferzellen stimuliert, auch durch andere Faktoren beeinflusst zu sein (106, 138). Konditioniertes Medium aus einer menschlichen T-Zell-Linie (Mo) stimulierte auch nach Entfernung von GM-CSA die CFU-DG, nicht aber die CFU-C (323). Kortikosteroide führen zu einer dosisabhängigen Steigerung der granulozytären Kolonien in DC (321), wogegen CFU-C in vivo und in vitro gehemmt werden (138, 280). Weiter wurde eine GM-CSA-unabhängige Stimulation der CFU-DG (102) und der DC-Granulopoese (315) durch Lithium gefunden. Aus konditioniertem Medium der menschlichen

HUT-102-Zell-Linie konnten chromatografisch verschiedene stimulatorische Aktivitäten für BFU-E, GEMM-CFC und CFU-DG abgetrennt werden (318, 316). Ob die für CFU-DG stimulatorischen Aktivitäten nur in vivo wirksam sind, oder nur die CFU-DG, nicht aber die in vitro erfassten Vorläuferzellen beeinflussen, ist nicht geklärt.

Das DC-Milieu stellt auch für leukämische Zellen ein gutes System zur Untersuchung des Wachstums (181, 86, 248, 174, 176, 180) und der Differenzierung dar (181, 123, 178, 86, 195). Daneben kann unter den In-vivo-Bedingungen der DC der Einfluß von leukämischen Zellen auf die normale Resthämato-poesie getestet werden. B8yum et al. beschrieben eine geringere Hemmung der Granulopoese durch polymorphkernige Granulozyten von CML-Patienten als durch Granulozyten von normalen Probanden (43). Im Gegensatz dazu fanden Jacobsen et al. und Miller et al. bei Ko-Kultivierungen von normalen Blutzellen mit leukämischen Blasten von AML-Patienten eine von den leukämischen Zellen ausgehende Hemmung der normalen Granulopoese, jedoch nur, wenn die Zellen direkten Zell-zu-Zell-Kontakt hatten (203, 289, 288). Bei Kultur der Zellen in Doppel-Diffusionskammern (DDC), in denen die normalen Zellen von den leukämischen durch eine semipermeable Membran getrennt waren, konnte von Franklin et al. (126) ebenfalls keine Hemmung beobachtet werden (126). Dagegen fanden Quesenberry et al. (355) mit DDC-Kultur eine Hemmung der granulozytären Vorläuferzellen und der CFU-S durch diffu-sible Substanzen.

Für die Implantation der DC wurden bisher Mäuse verschiedener Inzuchtstämme (22, 23), Ratten (343), Kaninchen (160, 424) und Ziegen (250) verwendet. Durch unterschiedliche Kulturbedingungen können das Wachstum und die Differenzierung verändert werden. Der Einsatz junger und kleiner Mäuse verbessert das Wachstum der Kulturzellen; das Geschlecht der Tiere spielt jedoch keine Rolle (23). Vorbehandlung der Versuchstiere mit ionisierenden Strahlen

(44, 47, 21) oder mit Verabreichung myelotoxischer Substanzen (412, 140, 327) führt zu einer Unterdrückung der immunologischen Reaktionen und zum anderen zur Zerstörung der hämatopoetischen Zellen. Dadurch wird die Produktion humoraler Faktoren ausgelöst, welche stimulierenden Effekt auf Stammzellen (44, 47) und granulopoetisch determinierte Vorläuferzellen (137) zeigen und zu ausgeprägter granulopoetischer Differenzierung der DC-Zellen führen. Die größte Stimulation wird durch Dosen erreicht, die in der Nähe der letalen Dosis liegen. Aufgrund der daraus resultierenden Knochenmarksaplasie sterben die Tiere innerhalb von 6-14 Tagen. Für längere Kulturperioden müssen die DC deshalb wöchentlich in neue Versuchstiere implantiert werden. Vermehrte Differenzierung in die erythrozytäre Reihe kann durch Anhebung des Erythropoetin-Spiegels im Mäuseserum entweder durch Zufuhr von exogenem Erythropoetin (44) oder durch Steigerung der körpereigenen Produktion über Phenylhydrazin-Injektionen (392) erreicht werden. Die größte Ausbeute an Erythropoese wurde durch Kombination mehrerer Vorbehandlungen erzielt. Walther et al. bestrahlten die Tiere vor der Implantation mit 7,5 gy und hielten sie in einer hypoxischen Kammer (421). Pojda et al. erreichten eine Stimulierung der Erythropoese und Granulopoese durch Vorbehandlung der Tiere mit Bestrahlung, Blutung und Phenylhydrazin-Injektionen (349). Jedoch ist die erythropoetische Differenzierung in DC auch unter optimalen Versuchsbedingungen geringer als in In-vitro-Kulturen (396, 9, 193).

3 Material und Methoden

3.1 Zellen

Für die Studie wurden mononukleäre Zellsuspensionen aus peripherem, heparinisiertem Blut (50 E Heparin ohne Stabilisator pro ml) von sieben Patienten mit cALL verwendet. Die Patienten, im Alter zwischen vier und 51 Jahren, waren noch nicht zytostatisch behandelt. Die hämatologischen Daten der kindlichen Patienten und die immunologische Charakterisierung ihrer malignen Zellen wurden von Lau und Mitarbeitern beschrieben (253). Bei allen Patienten konnten 92-98% der mononukleären Zellen morphologisch als leukämische Blasten eingeteilt werden, über 90% der mononukleären Zellen trugen das cALLA.

Vergleichswerte bildeten Versuche mit mononukleären Zellen aus normalem peripherem Blut von vier freiwilligen Spendern.

Mononukleäre Zellsuspensionen wurden durch Auftrennen des Blutes über Dichtegradienten-Zentrifugation gewonnen (46). Das Blut wurde in sterilen 25 ml Glasröhrchen über die gleiche Menge eines Ficoll-Isopaque-Gradienten geschichtet und 40 Minuten bei 400 g zentrifugiert. Die Ficoll-Isopaque-Lösung besteht aus 10 Teilen 33,9%igem Isopaque, 24 Teilen 9%igem Ficoll und hat eine Dichte von 1,077 g/ml (Seromed). Nach der Zentrifugation haben sich die Granulozyten und Erythrozyten auf dem Boden der Gläser abgesetzt, die mononukleären Zellen befinden sich in einer ringförmigen Schicht zwischen Plasma und Ficoll-Isopaque-Lösung. Von dort wurden die mononukleären Zellen vorsichtig mit der Pasteurpipette abgesaugt und in Medium 199 (Seromed) aufgefangen. Alle Zellsuspensionen wurden durch zweimalige 10minütige Zentrifugation bei 760 g gewaschen. Bei der letzten Waschung wurden dem Medium Antibiotika, 10 000 E Penicillin und 10 000 µg Streptomycin pro ml (Gibco Bio-Cult), hinzugefügt.

Für einen Teil der Versuche waren die Zellen, eingefroren in flüssigem Stickstoff bei -196°C , bis Versuchsbeginn aufbewahrt worden. Zum Einfrieren wurden die Zellsuspensionen auf eine Zellzahl zwischen 10×10^6 Zellen pro ml und 50×10^6 Zellen pro ml eingestellt und unmittelbar vor dem Einfrieren mit Einfriermedium im Verhältnis 1:1 gemischt. Das Einfriermedium bestand aus 60% Medium 199 (Seromed), 20% fötalem Kälberserum (FKS, Gibco) und 20% Dimethylsulfoxid (DMSO, Serva). Von dieser Mischung wurden je 1,5 ml in eine Ampulle (Bunc) gefüllt und mit einem automatischen Einfriergerät eingefroren. Zum Auftauen wurden die Ampullen mit der jeweiligen Zellsuspension etwa vier Stunden vor Versuchsbeginn aus dem flüssigen Stickstoff direkt in 37°C warmes Wasser gegeben. Nach vollständigem Schmelzen des Eises unter Bewegung wurde die Ampulle aus dem warmen Wasser genommen und zur Vermeidung der bei Wärme toxischen Wirkung des DMSO auf Eis gelegt. Nachdem die Zellen in ein Zentrifugenglas pipettiert worden waren, wurde unter Schütteln kaltes FKS im Verhältnis 1:1 zur eingefrorenen Zellsuspension getropft. Anschließend wurden DMSO und Serum durch sofortige, mindestens zweimalige Zentrifugation bei 400 g für 10 Minuten mit Medium 199 ausgewaschen.

Die permanente Zell-Linie Malm-6M1 wurde von Hurwitz et al. (188) aus peripheren Blasten einer akuten lymphoblastischen Leukämie vom non-T, non-B Typ eines 19jährigen Jungen etabliert. Die Malm-6M1 prägt das cALLA aus und enthält zytoplasmatisches IgM (zIgM).

Die permanente Zell-Linie Reh, entwickelt von Rosenfeld und Mitarbeitern (369, 370) aus peripheren Blasten eines 13jährigen Mädchens mit ALL vom non-T, non-B Typ während eines Rezidivs, zeigt das cALLA und ist negativ für IgG und E_s-Rosetten.

Beide Zell-Linien wuchsen unter streng sterilen Kautelen als Suspensionskulturen bei 37°C in RPMI-1640-Medium (Biochrom)

mit 10% inaktiviertem FKS (Seromed), 1,2% L-Glutamin (Gibco) sowie Zusatz von Antibiotika (Penicillin-Streptomycin 50 E pro ml, Gibco). Die Zellzahl lag zwischen 0,5 und $1,5 \times 10^6$ Zellen pro ml.

Vor den Versuchen fand eine Vitalitätsprüfung der Zellen statt. 20 µl Zellsuspension wurden mit der gleichen Menge einer 5%igen Trypanblaulösung (Seromed) gemischt und in eine Zählkammer nach Neubauer gegeben. Da sich nach längerem Stehen die Werte verändern, wurde sofort das Verhältnis der blau gefärbten, d. h. toten Zellen zu ungefärbten, d. h. lebenden Zellen bestimmt. Für alle Versuche wurden nur Zellsuspensionen verwendet, die mehr als 85% vitale Zellen enthielten.

Hammel-Erythrozyten dienten bei einem Versuch als Füllzellen zur Verbesserung des Wachstums. Frisch entnommenes Hammelblut wurde mit Alsever Lösung (Gibco Biocult) in einem Volumenverhältnis von 1:1,2 vermischt, dreimal mit phosphatgepufferter, isotoner Kochsalzlösung (PBS, Seromed) gewaschen und auf eine Konzentration von 60% Erythrozyten eingestellt.

3.2 In-vivo-Kultivierung von hämatopoetischen Zellen unter besonderer Berücksichtigung der Granulopoese

3.2.1 Diffusionskammer-Technik

Die DC-Technik wurde, wie von Lau (252) beschrieben, nach der Methode von Benestad (22) durchgeführt.

Bei allen DC-Versuchen wurden männliche CBA-Mäuse (343) mit einem Gewicht zwischen 25-30 Gramm (23) als DC-Empfänger verwendet. Die 8-12 Wochen alten Tiere stammten aus der Tierzucht der GSF. Jeweils 6-10 Tiere wurden zusammen in einem Käfig bei freier Zufuhr von Futter und Trinkwasser gehalten. Mindestens 2 Wochen vor Versuchsbeginn wurden die

Mäuse gegen Mäusepocken mit der Ektromelie-Impfstoff-Charge MVA 36/78 (Prof. Mahnel, Veterinärstr. 13, 8000 München 2) geimpft. Etwa 3-5 Stunden vor der DC-Implantation wurden die Tiere mit 8 gy letal bestrahlt (44, 47, 137). Dazu wurden jeweils 18 Mäuse in eine runde Plexiglastrommel mit radiär angeordneten Unterteilungen eingefüllt und zwischen zwei gegenüberliegende Gammastrahlenquellen im Abstand von jeweils 35 cm (Gerät HMW-2000 D, Hans Wälischmiller) gelegt. Die Dosisleistung betrug an dieser Stelle 1,20 gy pro Minute +/- 8%.

Die etwa ein Pfennig großen (Durchmesser: 14 mm) DC wurden mittels eines Schweißapparates nach Benestad et al. (23) angefertigt. Das Füllungsvermögen der DC beträgt 0,13 ml. Die DC bestehen aus einem 2 mm dicken, nichttoxischen Acrylglasring (U-100, Millipore) mit einer kleinen Öffnung von 0,6 mm, auf den beiderseits Millipore-Filtermembranen des Typs GS durch Hitze aufgeschmolzen sind. Die semipermeablen, bakteriendichten Membranen haben eine Porengröße von 0,22 µm (422, 4, 248, 306). Nach dem Abkühlen wurden die DC auf undichte Stellen überprüft (6), indem man die DC in ein Glas Aqua dest. hielt und über eine Kanüle Luft durch die Einfüllöffnung blies. Entwichen Luftblasen aus anderen Stellen als der Einfüllöffnung, wurden diese DC als unbrauchbar aussortiert. Vor den Versuchen wurden die DC 15 Stunden unter UV-Licht sterilisiert (392).

Zur Füllung der DC wurden die jeweiligen Zellsuspensionen mit Medium 199 (Seromed), welches 1% Antibiotika (10 000 E Penicillin und 10 000 µg Streptomycin pro ml, Gibco) enthielt, auf die entsprechende Zellzahl pro DC eingestellt. Wenn nicht anders angegeben, war die Einsaat pro DC 500 000 Zellen. Je 10 DC wurden in einen Plexiglasständer mit der Öffnung nach oben gelegt und von außen mit Medium angefeuchtet. Über die Öffnung wurden mit einer Tuberkulinspritze 0,1 ml der jeweiligen Zellsuspension eingefüllt. Danach wurde die Einfüllöffnung mit einem LötKolben zugelötet. Bis zur

Implantation wurden die DC bei Zimmertemperatur in Petrischalen mit sterilem Medium aufbewahrt.

Zur Implantation der DC wurden die Mäuse mit intraperitonealer Applikation von 0,3-0,4 ml Evipanlösung (0,5 g Evipan-Natrium pro 30 ml Aqua dest., Bayer) narkotisiert und in Rückenlage mit Metallklammern an den Vorder- und Hinterpfoten fixiert. Die Menge der zu applizierenden Evipanlösung wurde entsprechend dem Körpergewicht berechnet (Gramm-Gewicht entsprechende Anzahl ml + 0,07 ml Evipanlösung). Unter aseptischen Bedingungen wurde das Bauchfell in der Mitte von der Höhe der Schambeine bis kurz unterhalb des Processus xiphoideus sterni aufgeschnitten und beiseite geschoben. Das darunter freiliegende Peritoneum wurde vorsichtig mit der Pinzette angehoben und entlang der Linea alba durch eine etwa 1 cm lange Inzision eröffnet. Pro Maus wurden zwei DC mit einer gebogenen Pinzette in die Bauchhöhle geschoben. Anschließend wurden etwa 1 ml Medium 199 mit Antibiotika in den Peritonealraum injiziert. Zum Verschluss der Wunde wurden alle Gewebeschichten mit einer gebogenen Pinzette erfaßt und mit drei Michelklammern (Größe 11 x 2 mm) zugeklippt.

Nach jeweils 7 Tagen wurden die DC reimplantiert, d. h. in neue bestrahlte Mäuse verpflanzt (306). Dazu tötete man die Mäuse durch zervikale Dislokation. Nach Eröffnen der Bauchhöhle wurden die DC vorsichtig mit einer gebogenen Pinzette herausgenommen und mit einem sterilen Tupfer gründlich von Fibrin- und Zellauflagerungen, welche den Stoffaustausch stören, gereinigt. Anschließend wurden sie nach der oben beschriebenen Methode erneut in Mäuse implantiert.

Zur Ernte der Kulturzellen wurden die Mäuse ebenfalls getötet, die DC aus der Bauchhöhle entfernt und sorgfältig gesäubert. Um das während der Kultur in den DC entstandene Fibringerinnsel (7) aufzulösen, wurden die noch verschlossenen DC in sterile 15-ml-Gefäße mit 5 ml einer 0,5%igen Pronaselösung (Pronase E mit 70 000 POK pro g, E. Merck in

Medium 199) gegeben und 40 Minuten bei Zimmertemperatur auf einem Schüttelapparat in horizontaler Richtung geschüttelt (306). Zur Ernte des danach in Einzelzellsuspension vorliegenden DC-Inhalts wurde eine der Membranen mit einer Pasteurpipette durchstochen, der Inhalt aspiriert und zusammen mit 0,5 ml Medium 199, welches zum dreimaligen Spülen der DC verwendet wurde, in vorher abgewogene Reagenzgefäße gegeben. Der Spülvorgang diente zur Ablösung der noch an den DC-Innenwänden haftenden Zellen. Das Gewicht der Zellsuspension wurde mit der in einer Neubauer-Zählkammer bestimmten Zellzahl pro mm^3 multipliziert. Das Ergebnis entsprach der Anzahl der Zellen pro DC. Zur Entfernung der Pronase wurde die DC-Ernte zweimal mit Medium 199 10 Minuten bei 760 g gewaschen. Bei nachfolgender Weiterverwendung zur immunologischen Charakterisierung wurde zum Waschen Medium 199 ohne Zusatz von Phenolrot verwendet. Aufgrund der geringen Zellausbeute wurde bei einem Teil der Versuche der Inhalt aus mehreren DC vereint.

Zur morphologischen und zytochemischen Klassifizierung sowie bei Verwendung der Peroxidase-Antiperoxidase(PAP)-Methode wurden Zytozentrifugen-Präparate (Shandon LJ) hergestellt. Dies hat den Vorteil, daß selbst mit wenig Zellen eine befriedigende Charakterisierung der Zellen möglich ist. Die Zellsuspension wurde mit 25% FKS auf 20 000 bis 25 000 Zellen pro 200 μl für ein Zytozentrifugen-Präparat eingestellt und 10 Minuten bei 1000 g zentrifugiert. Zur morphologischen Differenzierung wurden die Zellen luftgetrocknet und 20 Minuten in Methanol fixiert. Anschließend folgte eine Färbung in einer phosphatgepufferten 7%igen GiemsaLösung (pH 7,2) für 25 Minuten. Die luftgetrockneten Präparate wurden für die Naphthol-AS-Azetat-Esterase(NAS)-Färbung 5 Minuten in Formalindampf, für die Naphthol-AS-D-Chlorazetat-Esterase(ASDCL)-Färbung 30 Sekunden bei 4 °C in einem Gemisch aus 10 ml Formalin 40% und 90 ml Methanol fixiert, anschließend 1 bis 2 Minuten gewässert und getrocknet. Die Färbung erfolgte wie unter Abschnitt 2.5 beschrieben.

Zellen, die zur immunologischen Charakterisierung bestimmt waren, wurden, wie in Abschnitt 2.6 beschrieben, weiterbehandelt.

3.2.2 Klonierung granulopoetischer Vorläuferzellen in Diffusionskammern (CFU-DG)

Die CFU-DG ist eine hämatopoetische Vorläuferzelle, die, in einem Fibringerüst fixiert, in 14 Tagen Diffusionskammerkultur Kolonien aus granulozytären Zellen bildet. Zur Bestimmung der Anzahl der CFU-DG im peripheren Blut von hämatologisch Gesunden und Patienten mit cALL wurden mononukleäre Blutzellen in einer Verdünnungsreihe zwischen 100 00 und 250 000 Zellen pro DC 14 Tage in DC kultiviert.

Die Vorbehandlung der Versuchstiere und die Herstellung der DC ist in Abschnitt 2.2.1 beschrieben worden. Die Zellen wurden, wie unter Kapitel 2.1 aufgeführt, über Ficoll-Isoopaque-Lösung separiert und zweimal mit Medium 199 gewaschen. Nach der letzten Zentrifugation wurden die mononukleären Zellen in einer Fibrinogenlösung (199) resuspendiert und auf die gewünschte Zellzahl eingestellt. Dazu wurde 0,5 g menschliches Fibrinogen (Serva-Feinbiochemica) in Medium 199 mit 1% Antibiotika (10 000 E Penicillin und 10 000 µg Streptomycin pro ml, Gibco Biocult) und 20% Serum von neugeborenen Kälbern (NCS, Gibco) gelöst. Das NCS wurde vorher für 30 Minuten bei 56 °C inaktiviert, um ein Wiederauflösen des "Clots" in den DC zu verhindern. Zur Füllung der DC wurden je 10 DC in einen Plexiglasständer mit der Öffnung nach oben gelegt. Ein Anhaften von Zellen an den Millipore-Membranen ließ sich durch vorheriges beidseitiges Anfeuchten der DC mit Medium 199 vermeiden. Mit einer Tuberkulinspritze wurden 0,13 ml der jeweiligen Zellsuspension in die DC-Öffnung eingefüllt. Nach Zugabe von 0,02 ml einer Thrombinlösung (entsprechend einer Einheit Thrombin, Merck) zur Koagulation des Fibrinogens (199) wurde die DC sofort mit einem Lötkolben

verschlossen und zur Verteilung der Zellen kurz geschüttelt (392). Anschließend wurden die DC für mindestens 5 Minuten zur gleichmäßigen Gerinnung des Fibrinogens waagrecht in eine Petrischale mit Medium 199 gelegt (392). 10 Minuten nach der Präparation geöffnete DC enthielten einen festen Fibrin-"Clot". Eine anschließend durchgeführte Fixierung und Färbung dieser "Clots" ergab eine gleichmäßige Verteilung einzelner Zellen. Zellaggregate waren nicht vorhanden. Die Implantation der gefüllten DC erfolgte innerhalb einer Stunde (392) nach der im Abschnitt 2.2.1 beschriebenen Methode.

Wie oben im Abschnitt 2.2.1 angegeben, wurden die DC nach 7 Tagen in neue bestrahlte Mäuse reimplantiert (196).

Zur Ernte der DC wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation am Tag 14 der Kulturperiode getötet. Die DC wurden aus den Mäusen entfernt und von anhaftendem Gewebe gereinigt. Die ungeöffneten DC wurden zur Fixierung (11) einzeln in 15-ml-Gefäße mit 5 ml Glutaraldehyd-Fixierlösung (pH 7,4) gegeben und mindestens 12 Stunden bei 4-7 °C aufbewahrt. Die Glutaraldehyd-Fixierlösung setzte sich aus 50 ml 0,2-molarer Natrium-Cacodylatlösung (Natriumsalz der Dimethylarsinsäure, Merck), 1,8 ml 0,2-normaler Salzsäure, 6,0 ml 25%iger Glutaraldehyd-Lösung (Merck) und 1,0 g Saccharose (Merck) ad 100,0 ml Aqua dest. zusammen. Anschließend wurden die DC 3-4mal mit Waschpuffer (pH 7,4) gespült und für mindestens 12 Stunden in diesen eingelegt. Der Waschpuffer bestand aus 50,0 ml 0,2-molarer Natrium-Cacodylatlösung, 1,8 ml 0,2-normaler Salzsäure und 7,0 g Saccharose ad 100,0 ml Aqua dest.. Mit einer Rasierklinge wurde eine der Millipore-Membranen vorsichtig entfernt. Der noch an dem Ring und der zweiten Millipore-Membran haftende "Clot" wurde mit der freien Seite auf einen Objektträger gelegt. Nach Lösung der zweiten Millipore-Membran wurde überschüssige Flüssigkeit mit einem Filterpapier aufgesaugt. Zur Untersuchung auf etwaige anhaftende Zellen oder Zellaggregate wurden beide Millipore-Membranen mit einer modifizierten Giemsa-Lösung, wie unten für die

DC-"Clots" angegeben, für 20 Minuten gefärbt. Danach wurden die trockenen, durch Eintauchen in Xylol durchscheinend gewordenen Membranen mit Eukitt eingedeckt. Bei der mikroskopischen Auswertung konnten keine Zellaggregate und nur sehr selten Zellen auf ihnen gefunden werden. Die "Clots" wurden zur morphologischen Auswertung mit einer modifizierten Färbung nach Pappenheim sofort nach Entfernen der Millipore-Membranen gefärbt. Dazu wurde 50%ige May-Grünwaldlösung (Merck) direkt über die "Clots" gegeben. Nach einer Minute wurden die "Clots" mit Puffer nach Weise (pH 7,2, Merck) überschichtet und nach einer weiteren Minute gründlich abgespült. Anschließend wurden die "Clots" für insgesamt 60 Minuten mit 5%iger Giemsa-Lösung (pH 6,6, Merck) gefärbt. Nach 30 Minuten wurde die Farblösung gewechselt. Nach weiterem gründlichem Abspülen mit Puffer nach Weise wurde der Acrylglasring mit einem Skalpell entfernt. Nachdem die "Clots" an der Luft getrocknet waren, wurden sie mit Eukitt eingedeckt. Die Auswertung erfolgte routinemäßig mit einem 40x10-Öl-Objektiv (Zeiss). Die Aggregate wurden nach Anzahl der Zellen, Zelltyp und Reifegrad beurteilt. Zur morphologischen Differenzierung (siehe Abschnitt 2.4) wurde ein 100x10-Öl-Objektiv verwendet. Alle Präparate wurden "blind" vom gleichen Untersucher ausgewertet. Zur Überprüfung der Reliabilität beurteilten vier Personen unabhängig und "blind" einen Teil der Präparate. Zellen galten als zugehörig zu einem Aggregat, wenn der Abstand zwischen zwei Zellen kleiner als ein Zelldurchmesser war (198). Als CFU-DG wurde ein Aggregat mit mehr als 30 granulozytären Zellen definiert (197).

3.3 In-vitro-Kultivierung von granulozytären Vorläuferzellen (CFU-C)

Die Anzahl der CFU-C wurde uns freundlicherweise von Dr. Netzel, Abteilung für Immunologie der GSF, wie von ihm und seinen Mitarbeitern beschrieben (307), nach der Methode für

menschliche Knochenmarkszellen von Pike und Robinson (346) bestimmt. Die CFU-C bildet in vitro unter dem Einfluß von "granulocyte macrophage colony-stimulating factor" (GM-CSF) in semisolidem Agar granulozytär-monozytäre Kolonien. Als GM-CSF-Quelle dient der "feeder layer" (165). Er kann etwa eine Woche bei 37 °C in einem CO₂-Inkubator mit 100% Luftfeuchtigkeit aufgehoben werden. Zur Herstellung des "feeder layer" wurde bis kurz vor den Siedepunkt erwärmter Agar (Difco) in 37 °C warmem, modifiziertem McCoy-Medium bis zu einer Endkonzentration von 0,5% gelöst. Das modifizierte McCoy-Medium setzte sich zusammen aus 80 ml McCoy-5A-Medium (Gibco), 0,6 ml Natriumbicarbonat 7,5% (Gibco), 1,0 ml Natriumpyruvat (100 mM-Lösung, Gibco), 0,4 ml Eagles-MEM-Vitamine (-18 °C, Gibco), 0,8 ml Eagles-MEM-essentielle-Aminosäuren (Gibco), 0,4 ml Eagles-MEM-nicht-essentielle-Aminosäuren (Gibco), 0,4 ml L-Glutamin (-18 °C, Gibco), 0,04 ml L-Serin (Gibco, 103 mg pro 5 ml McCoy-Grundmedium), 0,16 ml L-Asparagin (Gibco, 50 mg pro 5 ml McCoy-Grundmedium) und 1,2 ml Penicillin-Streptomycin 10 000 E (Gibco). Nach Abkühlen der Mischung auf 40 °C wurden 10⁶ periphere mononukleäre Blutzellen mit 35% Granulozyten und 15% FKS zu der Agarlösung gegeben. Bei Raumtemperatur ließ man einen Milliliter der Agarzellsuspension auf dem Boden einer Petrischale mit 35 mm Durchmesser (Greiner) gelieren. Der "overlayer" bestand aus 10⁶ der zu untersuchenden mononukleären peripheren Blutzellen in einer Lösung aus modifiziertem McCoy-Medium, 15% FKS und 0,3%igem Agar. Der "overlayer" wurde über den "feeder layer" pipettiert. Nach Erstarren des "overlayers" bei Raumtemperatur wurden die Kulturschalen für 12-14 Tage bei 37 °C in einer Atmosphäre mit 100% Luftfeuchtigkeit und kontinuierlicher Zufuhr von 5% CO₂ kultiviert. Die Auszählung der nach dieser Zeit entstandenen Kolonien (CFU-C) erfolgte mit einem umgekehrten Mikroskop (Leitz-Diavert). Eine Kolonie ist definiert als eine Einheit von mindestens 50 Zellen. Die In-vitro-Kultur sowie die vorbereitenden Präparationen fanden unter sterilen Bedingungen statt.

3.4 Morphologische Klassifizierung von Zellen

3.4.1 Morphologische Klassifizierung leukämischer Zellen

Die malignen Zellen der Patienten wurden nach den morphologischen Charakteristika der "French-American-British" (FAB)-Gruppe (26) eingeteilt. Bei den meisten Patienten entsprachen die leukämischen Blasten dem L1-Typ dieser Einteilung. Bei einem kleinen Teil der Erkrankten wurden die Zellen dem L2- oder L3-Typ zugeordnet.

3.4.2 Morphologische Klassifizierung von Diffusionskammerzellen

Bei der Auswertung der mit Giemsa-Lösung gefärbten Zellen im Lichtmikroskop (Zeiss) mit einem 100x10-Öl-Objektiv wurden mindestens 100 Zellen ausgezählt. Die Differenzierung granulözytärer Zellen wurde nach den Kriterien von Boll (37) vorgenommen. Monozyten wurden nach den Kriterien für Blutmonozyten von Meuret und Berlet (286) klassifiziert. Als Makrophagen wurden längsovale Zellen mit einem exzentrisch gelegenen runden oder nierenförmigen Kern nach van Furth et al. (416) eingeordnet. Große Makrophagen (Längsdurchmesser: 30-40 µm) zeigen ein rauchgraues vakuolisiertes Zytoplasma mit weit ausladenden Zytoplasma-Fortsätzen, das von feinen roten Granula durchsetzt ist. Kernnukleolen sind nur bei kleineren Makrophagen vorhanden. Bei diesem Makrophagentyp (Längsdurchmesser: 25-30 µm) ist das mittel- bis dunkelblaue Zytoplasma glatt oder nur wenig gelappt begrenzt. Die Einteilung von Zellen der erythrozytären Reihe erfolgte nach Wintrobe (429). Als lymphoide Zellen wurden rundliche Zellen mit einem Durchmesser von 8 µm entsprechend den "kleinen Lymphozyten" von Trepel (411) bezeichnet. Von diesen wurden lymphoide Blasten unterschiedlicher Gestalt mit einem Zelldurchmesser von 12-30 µm, abgegrenzt (411). Das auffallendste Merkmal der lymphoiden Blasten ist eine starke

Basophilie des meist reichlich vorhandenen Zytoplasmas, welches häufig Vakuolen enthält. Der Kern hat feingekörntes Chromatin mit 2-3 Nukleolen. Außerdem wurden Plasmazellen unterschieden. Die malignen Zellen wurden, wie oben im Abschnitt 2.4.1 beschrieben, nach der FAB-Klassifizierung (26) beurteilt.

3.4.3 Morphologische Klassifizierung der Kolonien bei der CFU-DG-Methode

Die nach der modifizierten Pappenheim-Methode gefärbten Kolonien wurden im Lichtmikroskop (Leitz) mit einem 100x10-Öl-Objektiv ausgewertet. Im Unterschied zu der üblichen Pappenheim-Methode hatten die Zellen bei der hier verwendeten Färbung einen schwächer gefärbten Kern, so daß das Kernchromatin nicht beurteilbar war. Nukleolen waren - wenn vorhanden - gut sichtbar. Die Granula färbten sich bei der modifizierten Pappenheim-Methode kräftiger mit dem jeweiligen Farbstoff an. Die Zellen wurden nach Größe und Form der Zelle als Ganzes, nach Größe und Form des Zellkerns, nach Vorhandensein von spezifischer Granulation und Nukleolen sowie nach Farbe des Zytoplasmas klassifiziert. Die Einteilung der granulozytären Zellen erfolgte nach den Kriterien von Boll (37). Längliche, spindelförmige, an Fibroblasten erinnernde Zellen mit dunkelblauem, nicht granuliertem Zytoplasma und mehreren Kernnukleolen wurden beobachtet. Größere Blasten mit einem schwach gefärbten Kern, mit mehreren gut erkennbaren Nukleolen sowie einem unterschiedlich breiten basophilen Zytoplasma-Saum konnten nicht weiter klassifiziert werden. Kleine runde Zellen mit rundem Kern und hoher Kern/Zytoplasmarelation wurden als lymphozytäre Zellen bezeichnet (41). Sehr große Zellen mit plumpe Kern, welcher meist keine Nukleolen enthielt, und schmalen, basophilen, nicht granuliertem, am Rand mit Ausstülpungen versehenem Zytoplasma wurden zur megakaryozytären Reihe (196, 352) gerechnet.

3.5 Zytochemische Farbreaktionen von Zellen der granulozytären und monozytären Reihe

3.5.1 Naphthol-AS-Azetat-Esterase (NAS)

Die größte Aktivität der NAS weisen monozytäre Zellen und Makrophagen auf, so daß sich das Verfahren besonders zur Identifizierung dieser Zellen eignet. Die Reaktion ist durch Natriumfluorid (NaF) hemmbar. Granulozytäre Zellen haben schwächere Esteraseaktivität als Monozyten, und es fehlt die Hemmbarkeit durch NaF. Lymphozytäre Zellen zeigen geringe NAS-Aktivität. Die NAS-Methode wurde nach Löffler (257) durchgeführt. Die fixierten Präparate wurden 70 Minuten bei Zimmertemperatur in einer Lösung aus 80,0 ml Phosphatpuffer nach Sørensen mit pH 6,8-7,0 (4 °C), 1,6 ml Propandiol (Merck), 1,5 ml Substratlösung (8 mg N-AS-Azetat, (Sigma, Aufbewahrung auf Kieselgel bei -18 °C), gelöst in 1,5 ml Aceton) und 160 mg Fast-blue-BB-Salt (Aufbewahrung auf Kieselgel bei -18 °C, Sigma) inkubiert. Beim Herstellen der Inkubationslösung mußte zuerst die Substratlösung langsam unter Schütteln dem Puffer mit Propandiol zugesetzt werden, dann wurde Echtblausalz dazugegeben, fest geschüttelt und filtriert. Nach 1-2minütigem Wässern der Präparate und anschließendem Lufttrocknen wurde eine Kerngegenfärbung nach Feulgen durchgeführt. Nach 10minütiger Hydrolyse bei 60 °C in 1normaler HCl und anschließendem Wässern in Aqua dest. für 2x2 Minuten erfolgte eine 30minütige Färbung in Schiff-schem Reagens nach Graumann. Das Schiff-sche Reagens setzt sich zusammen aus 0,5 g Pararosanilin (Bayer), gelöst in 15 ml 1normaler HCl und 0,5 g Kaliumdisulfit gelöst in 85 ml Aqua dest. Nach 48 Stunden wurde 0,3 g Aktivkohle zu der Lösung gegeben. Diese wurde dann nach 2-minütigem Schütteln filtriert und im Dunkeln bei 4-7° C bis zum Gebrauch aufbewahrt. Anschließend an die Färbung wurden die Präparate 3x2 Minuten in frisch bereitetem SO₂-Wasser (0,5 g Kaliummetabisulfit gelöst in 10 ml 1normaler HCl und 180 ml H₂O) gespült und danach 10 Minuten gewässert. Die Auswertung

erfolgte mit einem 100x10-Öl-Objektiv nach Einbetten in Glyzeringelantine. Eine positive NAS-Reaktion zeigte sich in Form blauer diffus-feinkörniger Verteilung des Reaktionsproduktes, das zu der roten Kernfärbung kontrastierte. Bei der Untersuchung der Zellen auf Hemmung der Reaktion durch NaF wurden 1,5 mg NaF (Merck) auf je 1 ml Phosphatpuffer zugegeben. Die Durchführung und Auswertung entsprach ansonsten der oben angegebenen NAS-Methode.

3.5.2 Naphthol-AS-D-Chlorazetat-Esterase (ASDCL)

Die ASDCL-Reaktion ist abhängig von dem Vorhandensein unspezifischer Esterase. Unter normalen Bedingungen findet sich diese ausschließlich in Zellen der neutrophilen, granulozytären Reihe und in Gewebemastzellen (258). Die Methode wurde erstmals von Moloney und Mitarbeitern beschrieben (293). Zur Herstellung der Inkubationslösung wurde das Substrat, 10 mg Naphthol-AS-D-Chlorazetat (bei -18° C Aufbewahrung auf Kieselgel, Sigma), gelöst in 0,8 ml Aceton, tropfenweise einer Lösung zugesetzt, die aus 10 ml Barbituratpuffer nach Michaelis (10,309 g 5,5-Diäthylbarbitursäure-Natriumsalz, Merck, ad 500 ml Aqua dest. mit 0,1 normaler HCl auf pH 7,4 eingestellt), 0,5 ml Propylenglykol und 10 ml Aqua dest. bestand. Nach Zugabe von 20 mg Echt-Granatsalz GBC (Aufbewahrung auf Kieselgel bei -18 °C, Practical Grade, Sigma) und anschließender Filtration wurden die Präparate 30 Minuten bei Zimmertemperatur im Dunkeln in der Lösung inkubiert. Nach 1-2minütigem fließendem Wässern erfolgte die Kernfärbung mit Mayers saurem Hämalaun (Merck) für ca. 15 Minuten. Anschließend wurden die Präparate in Leitungswasser für 10-15 Minuten gebläut und in Glyceringelantine (Merck) eingebettet. Bei der Auswertung mit einem 100x10-Öl-Immersionsobjektiv zeigten die Zellen im positiven Fall rostfarbenes, körniges oder homogenes Pigment, welches zur hellblauen Kernfärbung deutlich kontrastierte.

3.6 Immunologische Charakterisierung von Zellen

3.6.1 Antisera

Vor der Kultivierung in DC erfolgte eine immunologische Charakterisierung der leukämischen ALL-Blasten mit heterologen Antisera, die uns freundlicherweise Priv. Doz. Dr. Rodt, Abteilung für Immunologie der GSF, zur Verfügung stellte. Die zur Produktion von Anti-cALL-Globulin (AcALLG) verwendeten leukämischen ALL-Blasten prägten weder Mlg noch das T-Zellantigen oder einen E_a-Rezeptor aus (367). Bei der Spezifitätsprüfung reagierte das AcALLG nur mit leukämischen Zellen, die weder B- noch T-Zell-Merkmale zeigten. Nach Vorinkubation von Knochenmark oder mononukleären Blutzellen gesunder Personen mit AcALLG fand sich kein hemmender Einfluß auf CFU-C oder hämatopoetische Vorläuferzellen, die durch eine DC-Kultur erfaßt werden (308). Die monoklonalen Antikörper, die bei den Experimenten mit den Zell-Linien Nalm-6-M1 und Reh verwendet wurden, sind in Tabelle 2 zusammengefaßt. Als Kontrolle diente Mäuse-Aszites.

Antikörper	I Klasse	I Spezifität	I Referenz
Anti-cALL (Becton Dickinson)	I IgG 2a	I Non-T-ALL, B- und T-Zell-Tumore I Granulozyten	I 142 I
Anti-Leu-M ₁ (Becton Dickinson)	I IgG 2b	I Blutmonocyten, phagozytierende Zellen	I 101 I
Anti-Humaner B-Zell- Antikörper (WEN)	I IgG 2b	I normale und maligne B-Lymphozyten	I -- I
Anti-Humanes myeloisches Differen- zierungsantigen (Clone VIM-DS), (WEN)	I IgM	I neutro- und eosinophile Zellen	I 232 I I

Tabelle 2 Monoklonale Antikörper

* Monoklonale Antikörper entwickelt für
WEN durch Gen. Systems Corp., Seattle, WA

3.6.2 Immunfluoreszenz

In allen Fällen wurde Fluorescein-Isothiozyanat (FITC) als fluoreszierende Färbung verwendet. Die CALLA-positiven Zellen wurden mit direkter, die mit B-Zell-assoziiertem Antigen positiven Zellen mit indirekter Immunfluoreszenz bestimmt (135).

Zur Ermittlung einer geeigneten Verdünnung eines Antiserums wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt und Zellen einer bekannten Antigenkonstellation damit inkubiert. Als optimale Antiserumkonzentration wurde jeweils die vorletzte Verdünnungsstufe, die noch im Plateaubereich des Prozentsatzes markierter Testzellen lag, gewählt. Die für eine Markierung mit AcALLG vorgesehenen Zellen wurden 30 Sekunden bei 1400 g zentrifugiert, danach in phosphatgepufferter, isotoner Kochsalzlösung (PBS, pH 7,4) aufgeschwemmt und auf eine Zellzahl von 500 000-1 000 000 Zellen pro 10 µl eingestellt. 10 µl der gut resuspendierten Zellsuspension wurden mit 10 µl der FITC-markierten AcALLG-Verdünnung gemischt und 30 Minuten bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 2mal in PBS bei 4 °C gewaschen.

Zum Nachweis des B-Zell-assoziierten Antigens wurden die dafür vorgesehenen Zellen mit dem Maus-anti-humanen B-Zell-Antikörper (WEN) inkubiert und anschließend gewaschen. Die Bindung des Antikörpers wurde durch eine weitere Antigen-Antikörper-Reaktion mit einem FITC-gekoppelten Ziege-anti-Maus Anti-Immunglobulinserum (Becton Dickinson) sichtbar gemacht.

Zur Auswertung wurde ein Tropfen der Zellsuspension auf einen Objektträger gebracht, mit einem Tropfen Glycerin-PBS-Gemisch (Verhältnis 1:1, pH 8,6) versetzt und mit einem Deckglas vor dem Austrocknen geschützt. Die Auswertung der markierten Zellen erfolgte mit einem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss), das mit einem III/RS-Auflicht-Illuminator

ausgerüstet ist. FITC wird selektiv bei 490 nm angeregt. Mindestens 200 Zellen wurden innerhalb von 30 Minuten beurteilt.

3.6.3 Peroxidase-Antiperoxidase-Methode

Die Peroxidase-Antiperoxidase(PAP)-Methode (205) diente zum Nachweis von Granulozyten- und Monozyten-spezifischen Antigenen auf der Ebene der einzelnen Zelle. Nach vollständiger Blockierung der endogenen Peroxidase durch 48-Stunden-Inkubation mit Methanol und anschließendem 2maligen Waschen in PBS wurde der entsprechende Maus-anti-humane Antikörper nach vorheriger Austestung der Verdünnung über die Zellen geschichtet und bei 37 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach 30minütigem Waschen in PBS wurde ein Kaninchen-Anti-Maus-Ig auf die Zellen gegeben, 30 Minuten bei Zimmertemperatur inkubiert und wiederum 30 Minuten in PBS gewaschen. Zur Bindung des Peroxidase-Antiperoxidase-Komplexes wurde Maus-Antiperoxidase, gekoppelt mit Peroxidase, auf die Zellen geschichtet und bei Zimmertemperatur 30 Minuten inkubiert. Nach weiterem Waschen in PBS für 30 Minuten wurde zum Sichtbarmachen der Peroxidase die Diaminobenzidin-Reaktion durchgeführt. Die Auswertung erfolgte im Lichtmikroskop in Ölimmersion.

3.6.4 Einfluß von Pronase auf Oberflächenantigene

Um einen möglichen Einfluß der Vorbehandlung mit Pronase auf die Exprimierung von Oberflächenantigenen (cALLA, Granulo- oder Monozyten-assoziiertem Antigen) zu untersuchen, wurden Zellen der Walm-6-M1-Zell-Linie und der Walm-1-Zell-Linie 40 Minuten in einer Pronaselösung mit Konzentrationen zwischen 0,5 und 2% bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal in RPMI-1640-Medium gewaschen. Die Anzahl Antigen-positiver Zellen wurde gemäß den oben erwähnten

Verfahren bestimmt und mit den Ergebnissen ohne Pronasevorbehandlung verglichen.

3.7 Statistik

Die Ergebnisse der Diffusionskammer-Kultivierungen mit peripheren Blutzellen von Patienten mit non-T, non-B ALL und hämatologisch Gesunden sowie die Ergebnisse der CFU-DG-Bestimmungen sind als Mittelwerte mit Standardabweichungen angegeben. Der zweiseitige Students t-Test (344) wurde verwendet, um die statistische Signifikanz zwischen vergleichbaren experimentellen Gruppen zu bestimmen. Die Homogenität der einzelnen Messungen innerhalb einer Gruppe sowie die Unterschiede zwischen einzelnen Vertretern der Gruppen wurde mit Hilfe einer Varianzanalyse (344) getestet. Die berechneten Korrelationsgeraden (344) aus den CFU-DG-Bestimmungen von leukämischen Patienten und normalen Probanden wurden mit Hilfe eines Chi-Quadrat-Anpassungstests (344) miteinander verglichen. Die Prüfung der Reliabilität der morphologischen Auswertungen wurde mit einer Korrelationsanalyse (344) zwischen den beurteilenden Personen durchgeführt.

3.8 Experimentelles Design

Zur Entwicklung einer Methode zur Bestimmung der CFU-DG wurden mononukleäre Blutzellen zehn (352), 14 (198, 197, 319) und 21 Tage in DC in Fibrin-"clots" (199) mit Einsaaten zwischen 500 000 und 10 000 Zellen pro DC kultiviert. Zur Prüfung, ob die Gefrierprozedur einen schädigenden Einflusses auf die CFU-DG (326) hat, wurden vergleichende CFU-DG-Bestimmungen mit mononukleären Blutzellen eines hämatologisch gesunden Probanden direkt nach Blutabnahme sowie nach einem Gefriervorgang durchgeführt. Die routinemäßige Bestimmung der CFU-DG erfolgte wie unter Abschnitt 2.2.2 angegeben.

Mononukleäre Blutzellen von sieben Patienten mit cALL wurden 20 Tage in DC kultiviert. Vergleichswerte bildeten DC-Kultivierungen mononukleärer Blutzellen von vier hämatologisch Gesunden. Der DC-Inhalt wurde nach Zellzahl und Morphologie ausgewertet. Bei sechs Patienten mit cALL und bei vier normalen Probanden wurde die CFU-C vom Tag 0, bei drei cALL-Patienten und bei vier normalen Probanden die CFU-DG vom Tag 0 bestimmt (Abbildung 2).

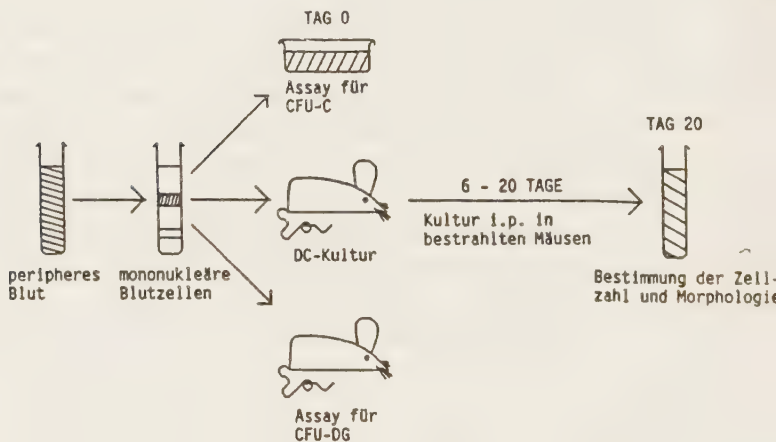


Abbildung 2 Experimentelles Design

Von zwei hämatologisch Gesunden und einem Patienten mit cALL wurden mononukleäre Blutzellen in einer Verdünnungsreihe zwischen 500 000 und 6 250 Zellen pro DC eingesät und über 20 Tage in DC kultiviert.

Da die Zellen bei geringen Einsaaten kaum proliferierten und deshalb die morphologische Auswertung sehr erschwert war, wurden je eine DC-Kultivierung normaler bzw. cALL-Zellen zusammen mit Fullerzellen zur Verbesserung des Wachstums durchgeführt. Als Fullerzellen wurden bei der cALL Hammel-Erythrozyten verwendet (49). Pro DC wurden 0,03 ml einer

60%igen Erythrozyten-Suspension zugegeben. Bei der Kultivierung normaler Zellen wurden zu den Kulturzellen autologe, mit 60 Gy letal bestrahlte, mononukleäre Blutzellen hinzugefügt. Die Zell-Einsaat pro DC betrug insgesamt (Kulturzellen und Füllzellen) 500 000. Der DC-Inhalt wurde an den jeweiligen Erntetagen nach Zellzahl und Morphologie ausgewertet. Bei allen Verdünnungsversuchen wurde am Tag 0 die CFU-C bestimmt.

Zellen der Nalm-6-M1-Zell-Linie wurden in fünf unabhängigen Experimenten in DC zwischen 20 und 41 Tagen kultiviert. Bei zwei weiteren Experimenten wurden Zellen der Reh-Zell-Linie über eine DC-Kultur von 20 Tagen untersucht. Beide Zell-Linien befanden sich in der stationären Phase der Suspensionskultur. Die Zellen wurden während den Kulturperioden nach morphologischen, zytochemischen und immunologischen Kriterien analysiert.

4 Ergebnisse

4.1 Vergleich der Kultivierung mononukleärer Blutzellen von Patienten mit akuter lymphoblastischer Leukämie vom common-Typ und gesunden Probanden in Diffusionskammern

4.1.1 Analyse des Wachstums

Das Wachstumsverhalten normaler mononukleärer Blutzellen in DC war bei allen Probanden einheitlich und reproduzierbar. Bei einer Einsaat von 5×10^6 Zellen pro DC nahm die Gesamtzellzahl zunächst, wie dies auch von anderen Autoren (175, 337, 247, 76) beschrieben wurde, bis Tag 6 der Kulturperiode stark ab, bis Tag 13 stieg sie an, und zum Tag 20 fiel sie erneut ab (Abbildung 3, Signifikanzniveau $> 99\%$).

Die initiale Abnahme des DC-Inhaltes ist nach Benestad (22) und Capalbo (67) zum einen bedingt durch mechanische Schädigung, entstanden bei der Vorbehandlung der Zellen, zum anderen durch die Eingewöhnung der Zellen an ihr verändertes Milieu. Eine weitere Zellvermehrung über Tag 13 hinaus konnte auch bei anderen Autoren (218) nicht beobachtet werden.

Die Proliferation war abhängig von der Zelleinsaat. Nur bei Einsaat von 5×10^6 Zellen pro DC kam es zu einem Wachstumsanstieg, bei geringeren Zelleinsaat blieb das Wachstumsniveau auf einem Wert von 5 bis 10% vom ursprünglichen Inhalt (Abbildung 3, Signifikanzniveau $> 99\%$).

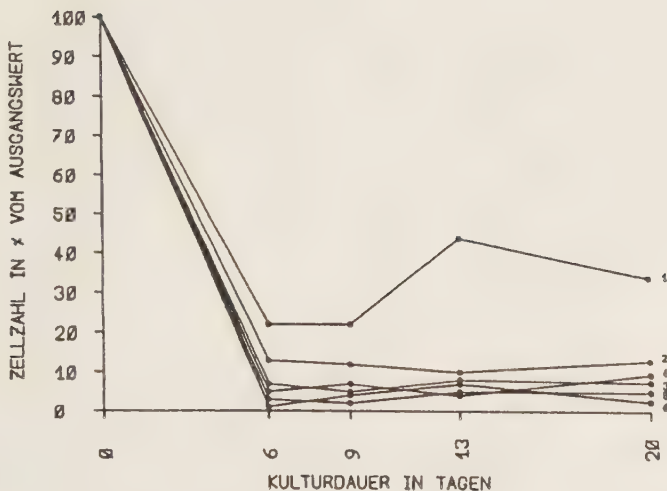


Abbildung 3 Wachstum von normalen mononukleären Blutzellen in DC: Abhängigkeit von der Zelleinsaat

Zellen/DC am Tag 0 ($\times 10^4$):

- | | | |
|---------|----------|-----------|
| (1) 5 | (2) 2,5 | (3) 1,25 |
| (4) 0,5 | (5) 0,25 | (6) 0,125 |

Durch Zugabe von autologen, letal bestrahlten, mononukleären Blutzellen als Füllzellen zur DC konnte das Wachstum auch bei sehr niedrigen Einsaaten deutlich verbessert werden (Abbildung 4, Signifikanzniveau $> 99,9\%$). Ebenfalls zeigten die Zellen dadurch einen Wachstumsanstieg zum Tag 13, wie er für Einsaaten von 5×10^4 Zellen pro DC beobachtet wurde.

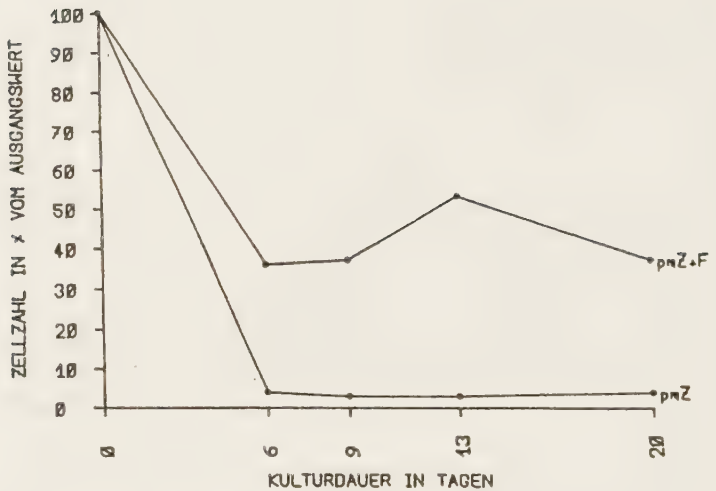


Abbildung 4 Wachstum von normalen mononukleären Blutzellen
in DC: Einfluß von Füllzellen

pmZ Einsaat von 125 000 peripheren mono-
nukleären Blutzellen pro DC am Tag 0

pmZ+F Einsaat von 125 000 peripheren
mononukleären Blutzellen und
475 000 letal bestrahlten Füllzellen
pro DC am Tag 0

Vor der Kultur eingefroren aufbewahrte Zellen wuchsen schlechter als direkt vor Kultur frisch vom gleichen Probanden abgenommene Zellen (Abbildung 5). Dies deutet auf einen schädigenden Einfluß des Einfrierens auf Zellen hin, wie er auch von Niskanen (326, 320) beschrieben wurde.

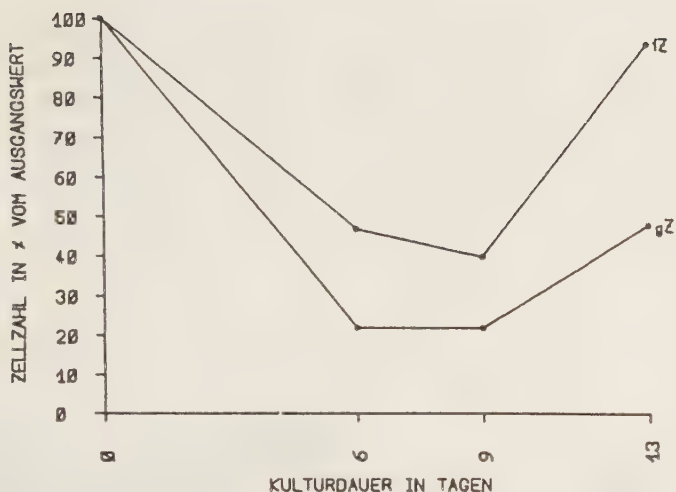


Abbildung 5 Wachstum von normalen mononukleären Blutzellen in DC: Einfluß der Einfrierprozedur

fZ vor der DC-Kultur frisch abgenommene Zellen
gZ vor der DC-Kultur eingefroren aufbewahrte Zellen

Bei allen cALL-Patienten war das Wachstumsverhalten der mononukleären Zellen in DC-Kultur ähnlich und reproduzierbar. Im Gegensatz zu den Zellen hämatologisch gesunder Probanden zeigten die Zellen der cALL-Patienten unabhängig von der Einsaat einen beträchtlichen Zellabfall bereits nach sechs Tagen, der bis zum Tag 20 anhielt (Abbildung 6, Signifikanzniveau > 99,9%). Dies stimmt mit den Beobachtungen anderer Autoren (253, 181, 123) überein. Bei einer Patientin kam es zu einem Zellzahlenanstieg zum Tag 13, der jedoch weit unter der ursprünglichen Zelleinsaat lag. Da aus versuchs-technischen Gründen ausschließlich vorher eingefroren

aufbewahrte Zellen verwendet wurden, ist nicht auszuschließen, daß das schlechte Wachstum der Zellen leukämischer Patienten teilweise durch schädigende Einflüsse auf die Zellen beim Einfrieren bedingt war, wie dies von uns und anderen Autoren (326, 320) für normale hämatopoetische Zellen gefunden wurde.

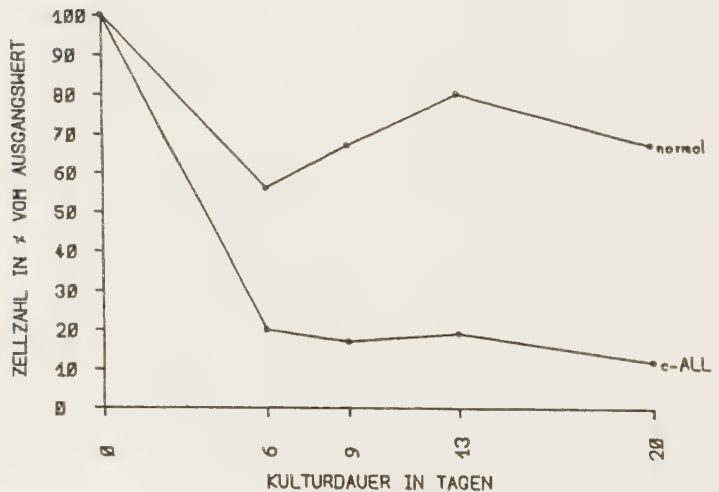


Abbildung 6 Wachstum von mononukleären Blutzellen in DC:
Vergleich zwischen cALL-Patienten und
hämatologisch Gesunden

Durch Zugabe von Hammel-Erythrozyten als Füllzellen zu den DC-Kulturzellen leukämischer Patienten erhöhte sich die Zellausbeute zum Tag 20 der Kultur um mindestens das 3fache (Signifikanzniveau > 99,9%).

4.1.2 Differenzierungsvermögen in die granulocytaire Reihe

Das morphologische Bild wurde bei den cALL-Patienten zu Kulturbeginn fast ausschließlich von leukämischen Blasten bestimmt. Diese sanken im Verlauf der Kulturperiode bis Tag 20 auf ein Minimum ab. In entsprechendem Maße stieg dafür die Granulopoese, vorwiegend aus unreifen Zellen (Abbildung 7, Tabelle 3) bestehend, bis zum Tag 20 auf im Mittel 75% des Kammerinhalts (Abbildung 8).

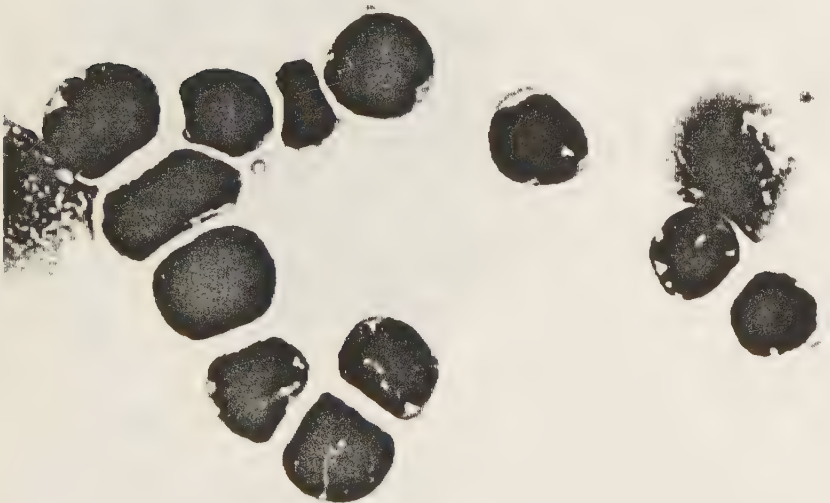


Abbildung 7 Morphologie der Zellen bei Patient T. H.

a) zu Kulturbeginn



Abbildung 7 Morphologie der Zellen bei Patient T. H.

b) nach 20 Tagen DC-Kultivierung

Morphologischer Phänotyp	I	Kammerinhalt in %
Myeloblasten	I	2
Promyelozyten	I	19
Myelozyten	I	29
Metamyelozyten	I	11
Stabkernige	I	7
Segmentkernige	I	
neutrophile Granulozyten	I	5
Granulopoese (total)	I	73
Makrophagen	I	3
lymphoide Zellen	I	24

Tabelle 3 Differentialblutbild des Patienten T. H.
am Tag 20 der DC-Kultur

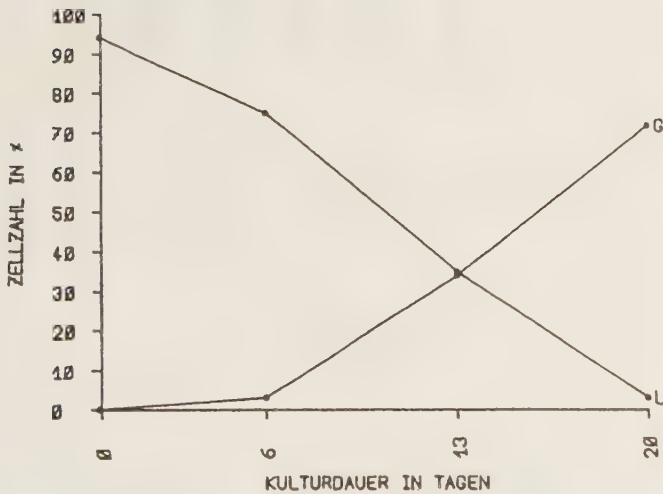


Abbildung 8: DC-Kultur mononukleärer Blutzellen von
cALL-Patienten: Beziehung zwischen der Anzahl
der leukämischen Blasten und der
granulopoetischen Differenzierung

L leukämische Blasten
G granulozytäre Zellen

Dies traf für alle untersuchten cALL-Patienten zu (Abbildung 9).

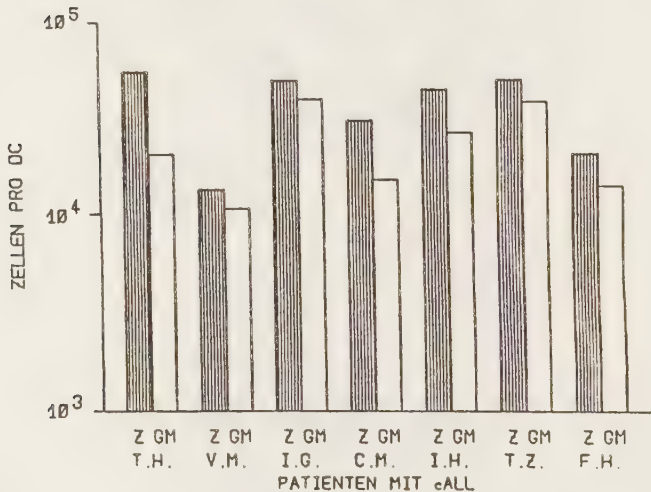


Abbildung 9: granulopoetische Differenzierung mononukleärer Blutzellen von Patienten mit cALL nach 20 Tagen DC-Kultivierung

Z Gesamtzellzahl pro DC

GM granulozytäre Zellen und Makrophagen

Bei der Kultur mononukleärer Blutzellen von normalen Probanden beherrschten lymphoide Blasten und lymphoide Zellen das Zellbild zum Tag 20 der Kulturperiode. Der Anteil der granulopoetischen Zellen war in der Regel maximal 40%. Die Granulopoese lag bei allen DC-Kulturen mononukleärer Blutzellen von normalen Probanden statistisch signifikant (Sicherheitswahrscheinlichkeit $> 99,9\%$) unter der Granulopoeseentwicklung bei cALL-Patienten (Abbildung 10, 11). Zusätzlich fanden sich am Tag 20 der DC-Kultur bei cALL-Patienten wie bei normalen Probanden vereinzelt

Erythroblasten, Megakaryozyten, basophile Mastzellen und eosinophile Granulozyten.

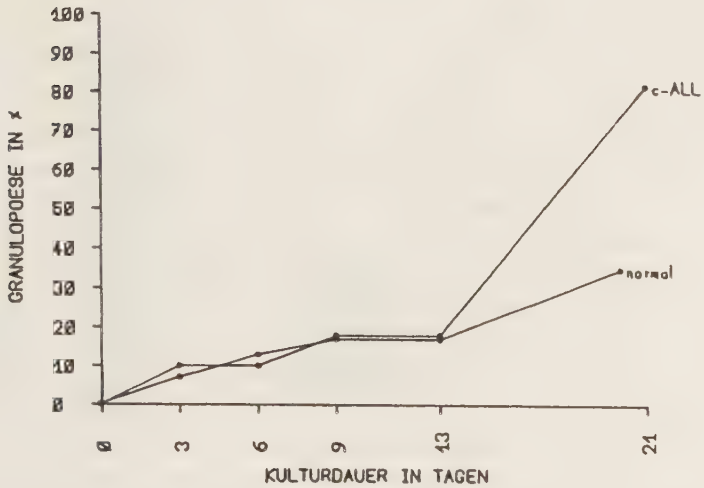


Abbildung 10: Granulopoetische Differenzierung mononukleärer Blutzellen in DC: Vergleich zwischen cALL-Patienten und hämatologisch Gesunden in prozentualer Darstellung

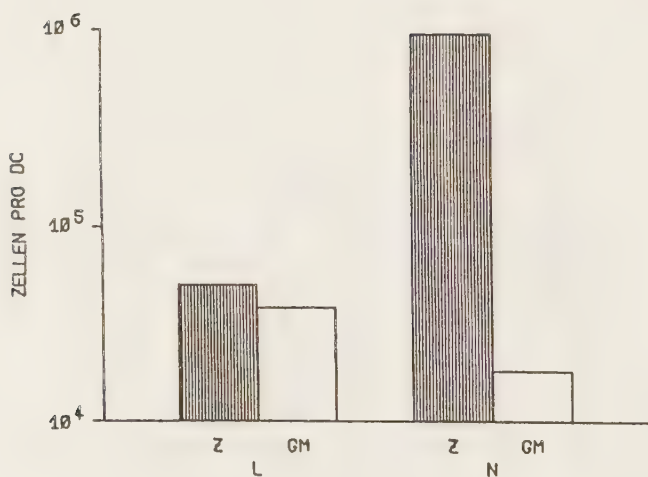


Abbildung 11: Granulopoetische Differenzierung mononukleärer Blutzellen in DC nach 20 Tagen DC-Kultivierung: Vergleich zwischen cALL-Patienten und hämatologisch Gesunden in Absolutzahlen

Z Gesamtzellzahl

GM granulozytäre Zellen und Makrophagen

L cALL-Patient

N hämatologisch gesunder Proband

4.2 Beziehung zwischen der granulozytären Differenzierung und der Anzahl der CFU-C bei gesunden Probanden und bei Patienten mit akuter lymphoblastischer Leukämie vom common-Typ

Der CFU-C-Gehalt der Patienten mit cALL lag, Übereinstimmend mit den Werten wie sie von Netzel et al. (310) berichtet wurden, bei Kulturbeginn zwischen 2-63 pro 10^6 periphere mononukleäre Zellen, auf 1 ml peripheres Blut bezogen zwischen 100-6600. Bei den hämatologisch Gesunden fanden sich zum Tag 0 der Kulturperiode zwischen 0-23 CFU-C pro 10^6 periphere mononukleäre Blutzellen. Unabhängig von der Anzahl der CFU-C betrug die Granulopoese am Tag 20 der Kulturperiode bei den cALL-Patienten zwischen 60-85% des Kammerinhaltes (Abbildung 12), bei den normalen Probanden 10-40%.

Heterologes AcALLG hat keinen zytotoxischen Einfluß auf hämatopoetische, mit dem CFU-C- und dem DC-Assay nachweisbare Vorläuferzellen (308). Folglich befinden sich die CFU-C unter den nicht-cALL-positiven Zellen. Entsprechend waren die zu Kulturbeginn bei Patient J. H. bestimmten 36 CFU-C unter den 10% mononukleären Zellen, welche nicht das cALLA ausprägten. Bei den Verdünnungsexperimenten dieses Patienten wurden zwischen 500 000 und 6250 Zellen pro DC eingesät. Bei der kleinsten Verdünnung enthielt eine DC 6250 mononukleäre Blutzellen. Davon waren 625 nicht-cALLA-positive Zellen. Unter diesen befanden sich 0,23 CFU-C. Im Mittel wurde demnach nur in jede vierte DC eine CFU-C gegeben. Unabhängig von der Einsaat und der Anzahl der eingegebenen CFU-C konnten in allen DC 60-84% granulozytäre Zellen gefunden werden. Dies traf auch auf die Gruppe zu, bei der nur jede vierte DC eine CFU-C enthielt (Abbildung 13).

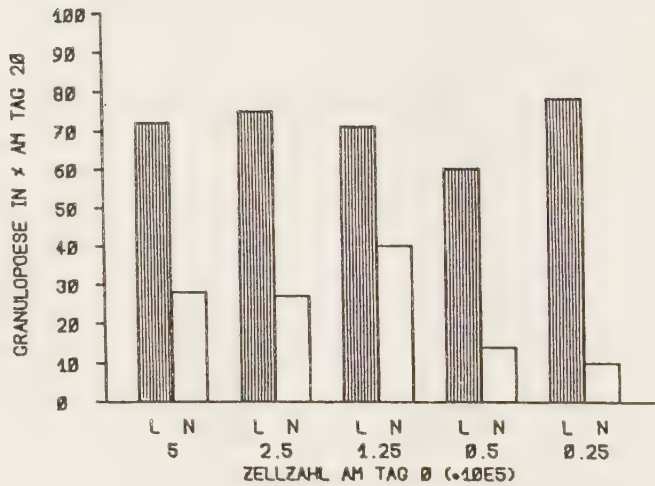


Abbildung 12 Granulopoetische Differenzierung mononukleärer Blutzellen in DC nach 20 Tagen DC-Kultivierung: Vergleich zwischen cALL-Patienten und hämatologisch Gesunden in Beziehung zur Zelleinsaat zu Kulturbeginn

L cALL-Patient

▨ hämatologisch gesunder Proband

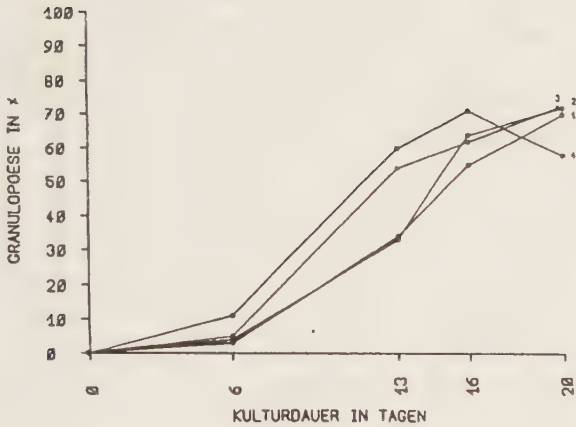


Abbildung 13 Granulopoetische Differenzierung mononukleärer
Blutzellen von Patienten mit cALL in DC:
Beziehung zwischen der granulopoetischen
Differenzierung und der Anzahl der CFU-C
zu Kulturbeginn

Einsaat pro DC am Tag 0 von

- (1) 5×10^6 Zellen, 18 CFU-C
- (2) $2,5 \times 10^6$ Zellen, 9 CFU-C
- (3) $1,25 \times 10^6$ Zellen, 4,5 CFU-C
- (4) $0,5 \times 10^6$ Zellen, 1,8 CFU-C

Bei den Verdünnungsversuchen der beiden hämatologisch gesunden Probanden war die entstandene Granulopoese der einzelnen DC zum Tag 20 der Kultur ebenfalls unabhängig von der Zelleinsaat und der Anzahl der CFU-C (Abbildung 14). Die entstandene Granulopoese lag hier im Unterschied zur cALL stets unter 40% der DC-Ernte (Abbildung 15).

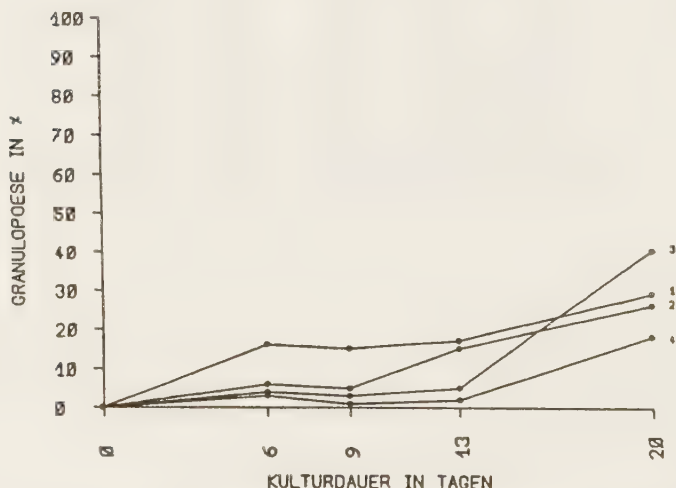


Abbildung 14 Granulopoetische Differenzierung mononukleärer Blutzellen von hämatologisch Gesunden in DC: Beziehung zwischen der granulopoetischen Differenzierung und der Anzahl der CFU-C zu Kulturbeginn

Einsaat pro DC am Tag 0 von

- (1) 5×10^5 Zellen, 2 CFU-C
- (2) $2,5 \times 10^5$ Zellen, 1 CFU-C
- (3) $1,25 \times 10^5$ Zellen, 0,5 CFU-C
- (4) $0,5 \times 10^5$ Zellen, 0 CFU-C

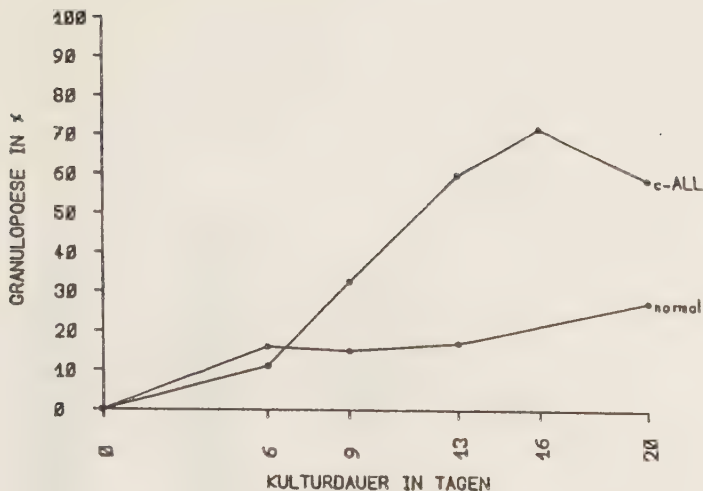


Abbildung 15 Granulopoetische Differenzierung mononukleärer Blutzellen in DC: Vergleich zwischen cALL-Patienten und hämatologisch Gesunden bei gleicher CFU-C-Einsaat (1,8 CFU-C pro DC) zu Kulturbeginn

Ein Einfluß der Füllzellen auf die Granulopoese-Entwicklung konnte weder bei Zugabe von Hammel-Erythrozyten zu den cALL-Zellen noch bei Verwendung von autologen, letal bestrahlten, mononukleären Blutzellen bei normalen Probanden nachgewiesen werden (Abbildung 16 und 17). Dies steht im Gegensatz zu den Beobachtungen bei In-vitro-Kulturen. Die Arbeitsgruppe um Bradley (49, 243) zeigte, daß Zusatz von gewaschenen Erythrozyten ein gesteigertes Wachstum von CFU-C und vermehrte granulozytäre Differenzierung bewirkt. Die in der Fraktion der mononukleären Blutzellen befindlichen Blutmonozyten stimulieren durch CSA-Produktion die Bildung granulozytärer Kolonien in vitro (134, 75). Im Unterschied zur In-vitro-Kultur beobachteten Elmgreen et al. (106) keine Erhöhung der CFU-DG-Anzahl durch bestrahlte mononukleäre Blutzellen.

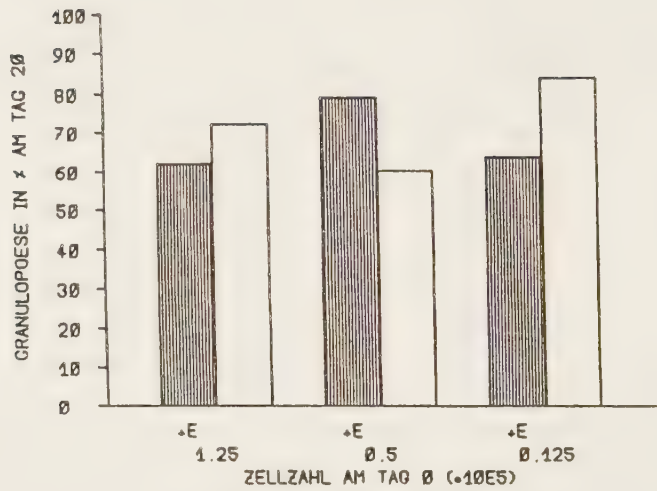


Abbildung 16 Granulopoetische Differenzierung mononukleärer
Blutzellen von Patienten mit CALL nach 20
Tagen DC-Kultivierung: Einfluß von Füllzellen

+E Zusatz von Hammel-Erythrozyten

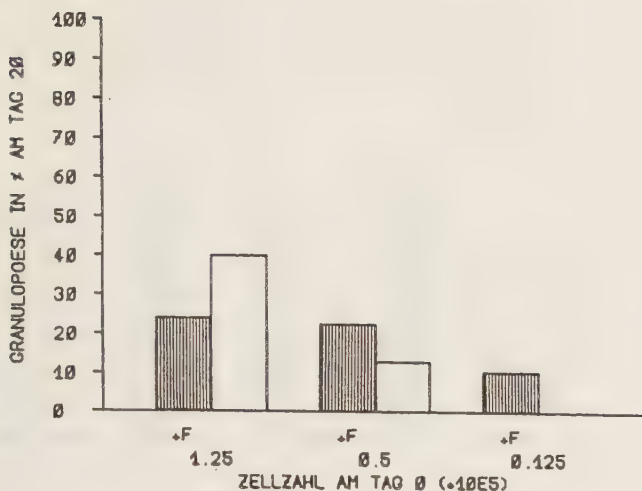


Abbildung 17 Granulopoetische Differenzierung mononukleärer Blutzellen von hämatologisch Gesunden nach 20 Tagen DC-Kultivierung: Einfluß von Füllzellen

+F Zusatz von letal bestrahlten, autologen mononukleären Blutzellen

Bei den Versuchen mit Füllzellen zur Verbesserung des Wachstums zeigte sich ebenfalls eine Unabhängigkeit der bis zum Tag 20 in DC entstandenen granulozytären Zellen von der Zelleinsaat und der CFU-C, sowohl bei den cALL-Patienten als auch bei den normalen Probanden. Die granulopoetische Differenzierung aus mononukleären Blutzellen von cALL-Patienten lag auch bei diesen Versuchen signifikant über der Granulopoeseentwicklung hämatologisch gesunder Probanden (Abbildung 18).

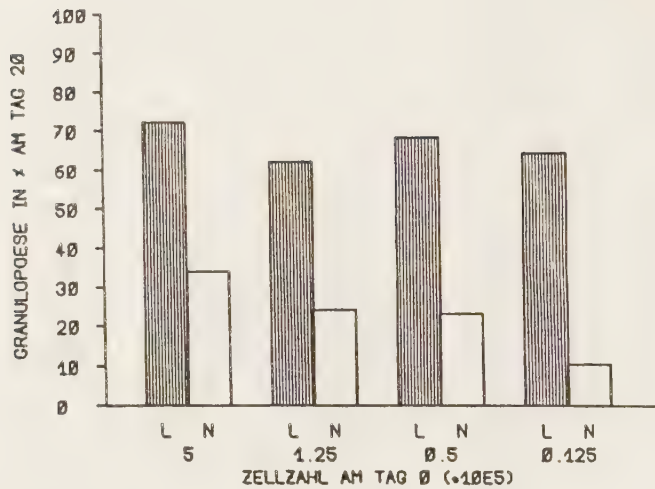


Abbildung 18 Granulopoetische Differenzierung mononukleärer Blutzellen nach 20 Tagen DC-Kultivierung mit Füllzellen zur Verbesserung des Wachstums: Vergleich zwischen cALL-Patienten und hämatologisch gesunden Probanden

L cALL-Patient

N hämatologisch gesunder Proband

4.3 Klonierung von granulozytären Progenitoren (CFU-DG) bei hämatologisch Gesunden und Patienten mit akuter lymphoblastischer Leukämie vom common-Typ in Diffusionskammern

4.3.1 Wachstum

Zur Entwicklung einer Methode die CFU-DG zu bestimmen, wurden 10 000 bis 500 000 mononukleäre Blutzellen von hämatologisch gesunden Probanden zehn, 14 und 21 Tage in Fibrinclot-DC kultiviert. Die Erkennung von Zellaggregaten bei Ernte am Tag 10 war aufgrund vieler einzeln liegender Zellen und kleiner Zellaggregate (<5 Zellen) erschwert. Die Größenverteilung granulozytärer Aggregate am Erntetag 14 ist in Abbildung 19 dargestellt. Ähnliche Daten für die Größe granulozytärer Aggregate erhielten Jacobsen und Fauerholdt (196). Die Größe der Kolonien war unabhängig von der Zelleinsaat. Die am Tag 21 gefundenen Aggregate bedingten durch ihre größere Anzahl von Zellen pro Aggregat Probleme bei der Auswertung, da die Aggregate nicht sicher voneinander abgegrenzt werden konnten. Folglich wurde, in Übereinstimmung mit Jacobsen und Fauerholdt (196), für die routinemäßige Bestimmung der CFU-DG Tag 14 als Erntetag gewählt.

In Übereinstimmung mit Jacobsen und Fauerholdt (198) wurden Aggregate mit 30 oder mehr granulozytären Zellen als eine CFU-DG definiert.

Die Beziehung zwischen Zelleinsaat zu Kulturbeginn und Anzahl der CFU-DG am Tag 14 ist in Abbildung 21 (siehe Abschnitt 4.3.3) dargestellt. Erhöhung der Zelleinsaat ergab eine Erhöhung der CFU-DG-Anzahl. Zur Entstehung der Kolonien war eine minimale Zelleinsaat notwendig. Diese Beobachtung wurde auch von Jacobsen und Fauerholdt (198) gemacht. Das Vorhandensein eines Schwellenwertes für das Kolonienwachstum wird durch die mit Regressionsanalysen bestimmten negativen y-Abschnitte unterstützt. Im Bereich zwischen 10 000 und

250 000 Zellen verlief das Wachstum der CFU-DG proportional zur Einsaat. Darüber hinaus war eine Auswertung aufgrund sich Überlagernder Kolonien und Zellen nicht möglich.

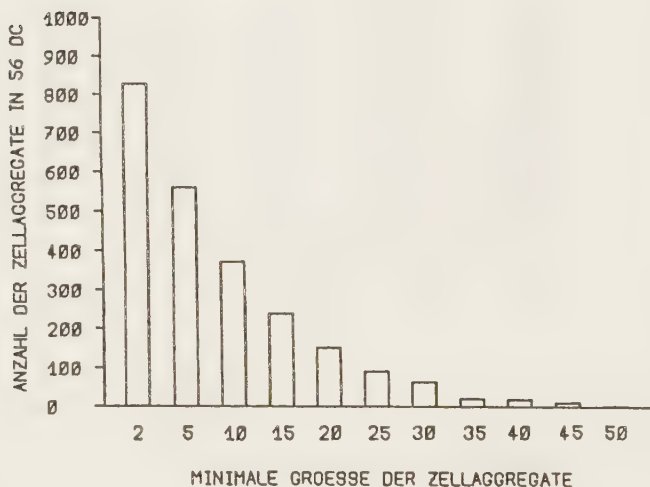


Abbildung 19 Größenverteilung granulopoetischer Zellaggregate am Tag 14 der DC-Kultur

Aus versuchstechnisch bedingten Gründen mußten die Zellen von cALL-Patienten bis zum Versuchsbeginn eingefroren aufbewahrt werden. Zur Prüfung, ob die Gefrierprozedur einen schädigenden Einfluß auf die CFU-DG hat, wurden vergleichende CFU-DG-Bestimmungen mit mononukleären Blutzellen eines hämatologisch gesunden Probanden direkt nach Blutabnahme sowie nach einem Gefriervorgang durchgeführt. Der Verlust von CFU-DG durch die Gefrierprozedur betrug maximal 30%. Dies steht im Gegensatz zu Untersuchungen von Niskanen (326), der eine durch das Einfrieren bedingte Verminderung der Anzahl der CFU-DG um 85% fand.

Die Auszählung und morphologische Beurteilung der Kolonien erfolgte "blind" durch vier unabhängige Personen. Die erhalten Daten korrelierten im Schnitt mit einem Korrelationskoeffizienten von +0,85.

4.3.2 Analyse der Kolonien nach morphologischen Kriterien

Zellen innerhalb eines Aggregates hatten den gleichen Reifegrad. Nur vereinzelt wurden Kolonien gefunden, die Zellen mit unterschiedlichen Reifegraden enthielten. Zwischen Promyelozyten und segmentkernigen Granulozyten konnten alle Reifestufen beobachtet werden; Überwiegend bestanden die Kolonien aus Promyelozyten und Myelozyten (Abbildung 20). In sehr geringer Zahl kamen eosinophile oder basophile Kolonien vor. Megakaryozyten lagen einzeln oder in kleinen Aggregaten von 2 bis 5 Zellen. Fibroblastenähnliche Zellen bildeten große Kolonien mit meist mehr als 100 Zellen. Blasten formten Aggregate unterschiedlicher Größe, wobei etwa 50% der Blastenaggregate mit lymphoiden Zellen gemischt waren. Rein lymphoide Aggregate enthielten meist zwischen 5-15 Zellen. Mischaggregate aus granulozytären Zellen und Blasten waren mit etwa 5% vertreten. Jacobsen und Fauerholdt (196) sowie Preisler et al. (352) machten ähnliche Beobachtungen hinsichtlich Vorkommen und Verteilung der Zellaggregate. Die bei Kultur mononukleärer Blutzellen von cALL-Patienten gefundenen Zellaggregate entsprachen im morphologischen Zelltyp und im Reifegrad den oben beschriebenen, aus normalen mononukleären Blutzellen entstandenen Aggregaten.

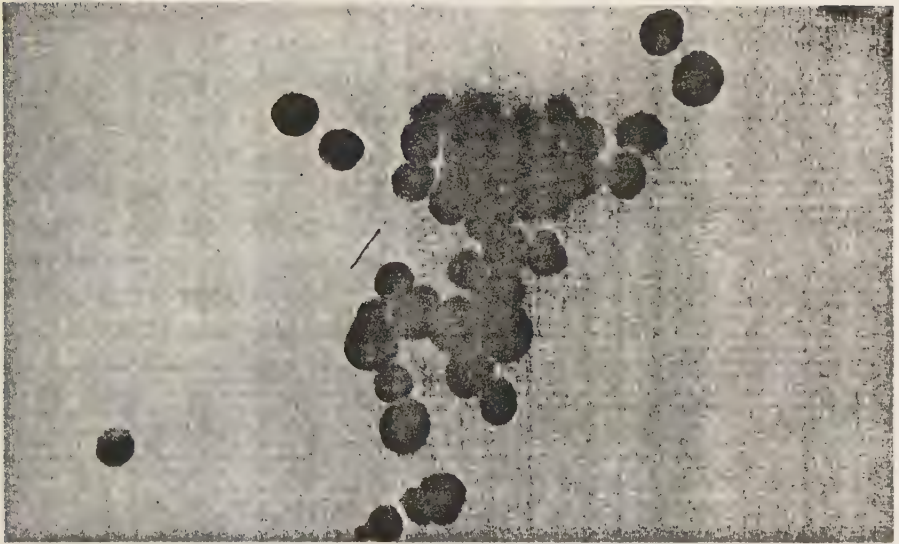
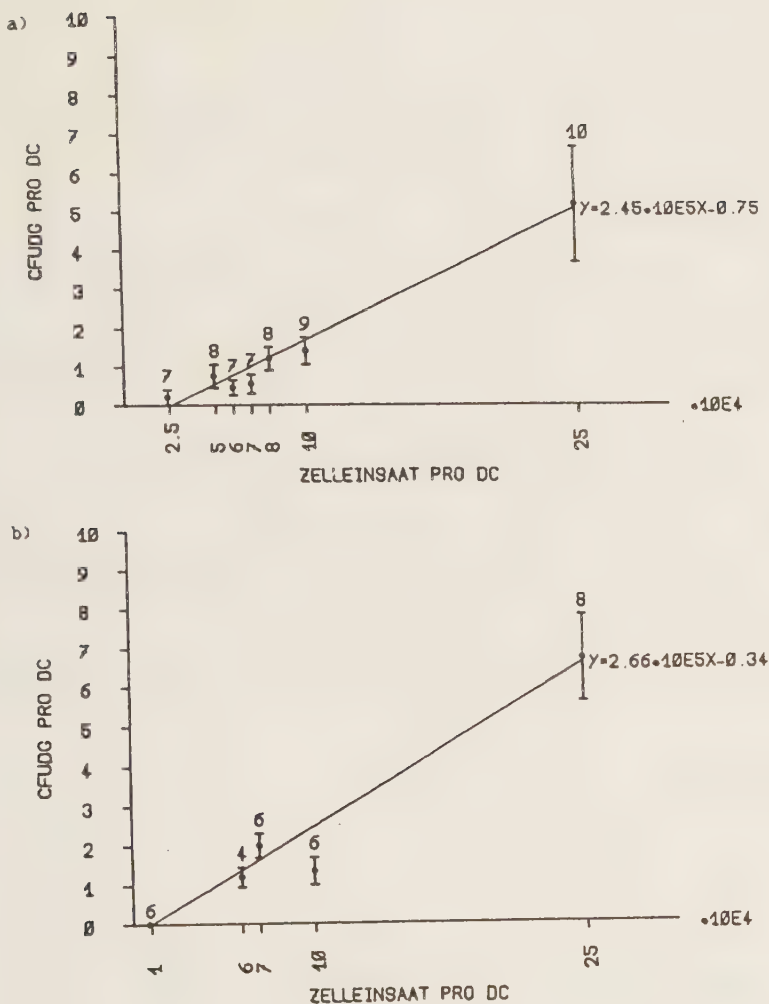


Abbildung 20 Morphologie granulozytärer Aggregate am Tag 14
der DC-Kultur

4.3.3 Anzahl der Kolonien bei hämatologisch gesunden Probanden und bei Patienten mit akuter lymphoblastischer Leukämie vom common-Typ

Nach Untersuchungen von Jacobsen et al. (202, 200) und Niskanen et al. (329) kann angenommen werden, daß die CFU-DG eine granulozytäre Vorläuferzelle ist, die im Reifegrad zwischen der pluripotenten Stammzelle und der CFU-C steht. Durch Bestimmung der zu Beginn der Kulturperiode vorhandenen Anzahl an CFU-DG wurde versucht zu beantworten, ob die CFU-DG als Ursache für die, bei DC-Kultur mononukleärer Blutzellen von cALL-Patienten gegenüber normalen Probanden vermehrte Granulopoese in Frage kommt. Die zum Tag 14 bestimmten Kolonien zeigten gleiches Aussehen und gleiche Verteilung der Reifegrade granulozytärer Zellen bei normalen Probanden wie bei den cALL-Patienten, vermutlich wurde die gleiche Vorläuferzelle bei hämatologisch Gesunden wie bei cALL-Patienten erfaßt. Ähnliche Ergebnisse wurden von Gordon (139) bei der ADC-Kultivierung normaler und leukämischer Knochenmarkszellen der Maus gefunden. Abbildung 21 stellt einen Vergleich der Anzahl der CFU-DG vom Tag 0 zwischen einem gesunden Probanden und einem Patienten mit cAll dar. Die Anzahl der CFU-DG variierte bei den Gesunden zwischen 0,3-8,5 CFU-DG pro 10^6 peripheren mononukleären Blutzellen, bei den cALL-Patienten zwischen 1,5-10,9 CFU-DG pro 10^6 peripheren mononukleären Blutzellen. Die Gleichheit der Anzahl der CFU-DG zwischen normalen Probanden und cALL-Patienten kann mit einer Sicherheitswahrscheinlichkeit von 99% angenommen werden.

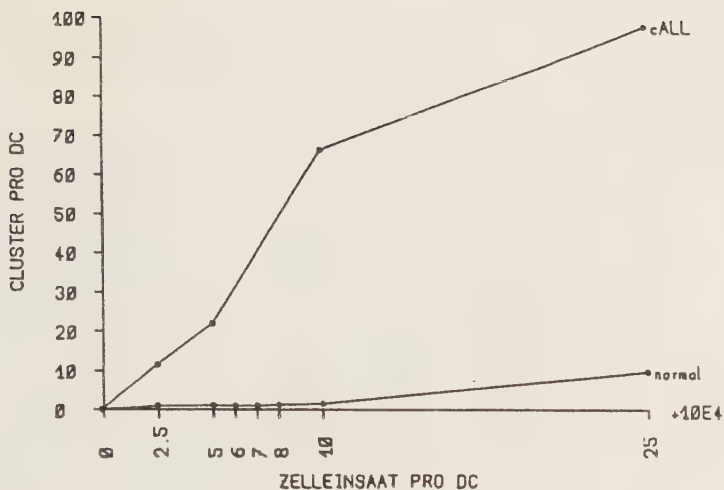


Abbildungung 21 Kultivierung mononukleärer Blutzellen in DC:
Bestimmung der Anzahl der CDF-DG bei
a) Gesunden und b) Patienten mit cALL
Die Abbildungen enthalten Mittelwerte mit
Standartabweichungen sowie die Anzahl der DC
pro Zelleinsaat. Der Korrelationskoeffizient
beträgt bei a) 0,97 und bei b) 0,98.

4.3.4 Anzahl der granulozytären "Cluster" bei hämatologisch Gesunden und bei Patienten mit akuter lympho- blastischer Leukämie vom common-Typ

Mit einer Sicherheitswahrscheinlichkeit von 97,5% war die Anzahl der granulozytären "Cluster" bestehend aus 10-15 Zellen bzw. 15-20 Zellen bei Kultur normaler mononukleärer Blutzellen geringer als bei Kultur mononukleärer Blutzellen von Patienten mit cALL (Abbildung 22). Für die Anzahl von "Cluster" mit einer Größe von 20-25 Zellen und von 25-30 Zellen konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen normalem Blut und Blut von cAll-Patienten gefunden werden. Über die Anzahl weniger als 10 Zellen betragender "Cluster" liegen keine statistischen Auswertungen vor, da eine Auszählung aufgrund der großen Anzahl einzeln und in kleinen Aggregaten liegender Zellen häufig nicht möglich war. In der Morphologie und im Reifegrad entsprachen sich die von Blutzellen hämatologisch Gesunder und cALL-Patienten gebildeten "Cluster".

a)



b)

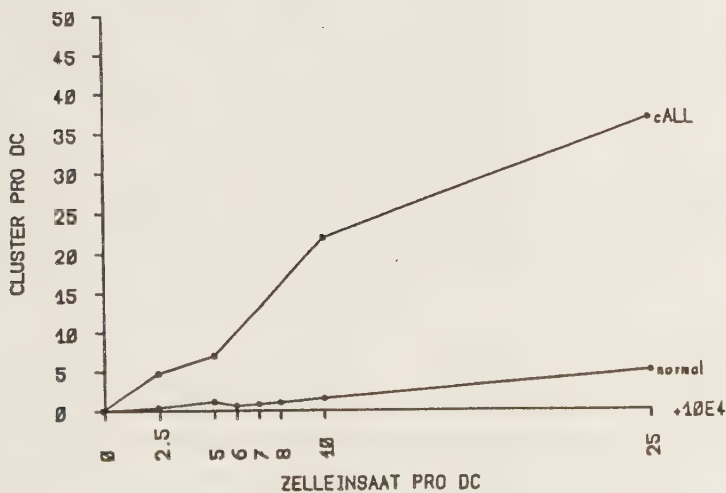


Abbildung 22 Kultivierung mononukleärer Blutzellen in DC:
Bestimmung der Anzahl der "Cluster" bestehend

a) aus 10-15 Zellen pro Aggregat

b) aus 15-20 Zellen pro Aggregat

4.4 Kultivierung von leukämischen Zell-Linien des non-T, non-B Typs in Diffusionskammern

Das Wachstum der Nalm-6-M1-Zellen während fünf DC-Kultivierungen war ähnlich und durch einen starken Abfall der Zellzahl zum Tag 6 der Kulturperiode mit nachfolgendem Wachstum über die gesamte Kulturdauer gekennzeichnet (Abbildung 23). Bei einem der Experimente (Nr.3 in Tabelle 4) konnte kein initialer Zellabfall beobachtet werden. Das Wachstumsverhalten der Zellen der Reh-Zell-Linie glich dem der Nalm-6-M1-Zellen, wobei nach dem Zellabfall zu Tag 3 bereits zum Tag 6 ein Wachstumsanstieg erfolgte.

In Abbildung 23 ist die Veränderung des immunologischen Phänotyps während einer 34tägigen DC-Kultur von Nalm-6-M1-Zellen (Experiment 1 aus Tabelle 4) dargestellt. Zu Beginn der Kulturperiode konnte nur das B-Lymphozyten-assoziierte Antigen auf den Zellen gefunden werden. Von Tag 13 an traten cALL-positive Zellen auf, die bis Tag 34 auf 85% des DC-Inhalts zunahmen. Granulozyten- und Monozyten-spezifische Oberflächenmarker wurden in geringen Zahlen zuerst zum Tag 6 nachgewiesen. Ihren höchsten Wert (15% des DC-Inhalts) erreichten sie zum Tag 34. Die immunologischen Veränderungen wurden von dem Erscheinen ASDCL-positiver Zellen begleitet, die bis maximal 40% zum Tag 27 der Kulturperiode anstiegen (Abbildung 24, Tabelle 4). Zusätzlich wurden NAS-positive Zellen beobachtet, die morphologisch Makrophagen ähnelten (Abbildung 25). Die NAS-Reaktion war jedoch nicht durch NaF hemmbar. Mehr als 95% der Nalm-6-M1-Zellen behielten morphologisch ihr Blasten-ähnliches Aussehen.

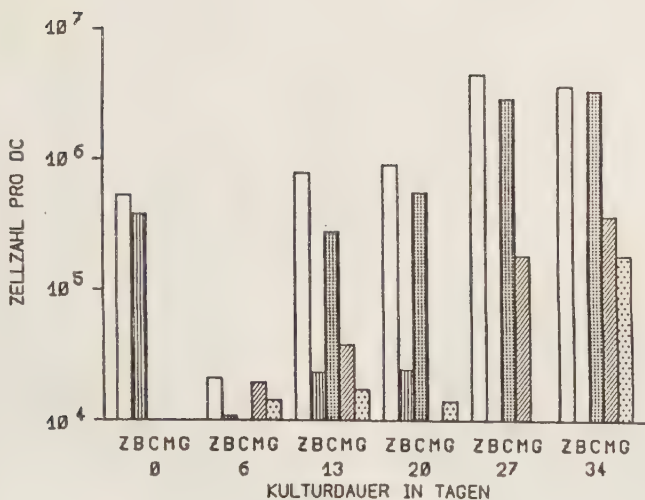


Abbildung 23 Kultivierung von Nalm-6M1-Zellen in DC:
Verhältnis der Gesamtzellzahl (Z) pro DC zur
Anzahl der Zellen pro DC, welche das
B-Lymphozyten-assoziierte Antigen (B),
cALLA (C),
Granulozyten-spezifische Antigen (G) oder das
Monozyten-Makrophagen-spezifische Antigen (M)
ausprägen

Bei jedem der weiteren vier Experimente traten im Verlauf der Kulturperiode nahezu an allen Erntetagen Zellen auf, die Granulo- oder Monozyten-spezifische Membranmarker ausprägten (Experimente 2-5, Tabelle 4). Gleichzeitig waren ASDCL-positive Zellen vorhanden. Allerdings stimmte deren Anzahl nicht mit der Zahl der Zellen, die Granulo- oder Monozyten-spezifisches Antigen trugen, überein.

Experiment		Kulturdauer in Tagen					
		Tag 6	Tag 13	Tag 20	Tag 27	Tag 34	Tag 41
I	Gesamtzellzahl/DC	0.22	7.63	8.36	45.00	37.10	
	Gran. A. pos. Z./DC ²⁾	0.04	0.15	0.08	0.00	1.86	
	Mono. A. pos. Z./DC ³⁾	0.14	0.38	0.00	1.81	3.71	
	ASDCL pos. Zellen/DC	0.00	0.08	0.08	18.00	8.53	
II	Gesamtzellzahl/DC	0.40	1.10	5.90	24.00	38.00	
	Gran. A. pos. Z./DC ²⁾	n.u.	1.00	1.80	1.40	34.00	
	Mono. A. pos. Z./DC ³⁾	n.u.	0.00	0.00	13.00	0.00	
	ASDCL pos. Zellen/DC	0.04	0.30	1.30	0.20	2.70	
III	Gesamtzellzahl/DC	6.00	6.80	118.00	110.00	142.00	178.00
	Gran. A. pos. Z./DC ²⁾	0.90	0.00	0.00	0.00	0.00	7.10
	Mono. A. pos. Z./DC ³⁾	0.00	0.00	0.00	0.00	7.11	32.00
	ASDCL pos. Zellen/DC	0.00	0.10	20.00	21.00	9.90	7.10
IV	Gesamtzellzahl/DC	0.50	7.80	42.00			
	Gran. A. pos. Z./DC ²⁾	0.10	0.00	0.00			
	Mono. A. pos. Z./DC ³⁾	0.00	0.20	2.10			
	ASDCL pos. Zellen/DC	0.40	0.40	0.90			
V	Gesamtzellzahl/DC	1.70	6.50	15.30			
	Gran. A. pos. Z./DC ²⁾	0.10	0.40	1.80			
	Mono. A. pos. Z./DC ³⁾	0.00	0.00	0.20			
	ASDCL pos. Zellen/DC	0.03	0.10	1.10			

Tabelle 4 Kultivierung von Malm-6M1-Zellen in DC:
Verhältnis der Gesamtzellzahl pro DC zur
Anzahl ASDCL-positiver Zellen und zur
Anzahl der Zellen, die das
Granulozyten-spezifische Antigen (2)
oder Monozyten-spezifische Antigen (3)
ausprägen

(1) Zellzahl x 10⁶

(4) nicht untersucht

a)

b)

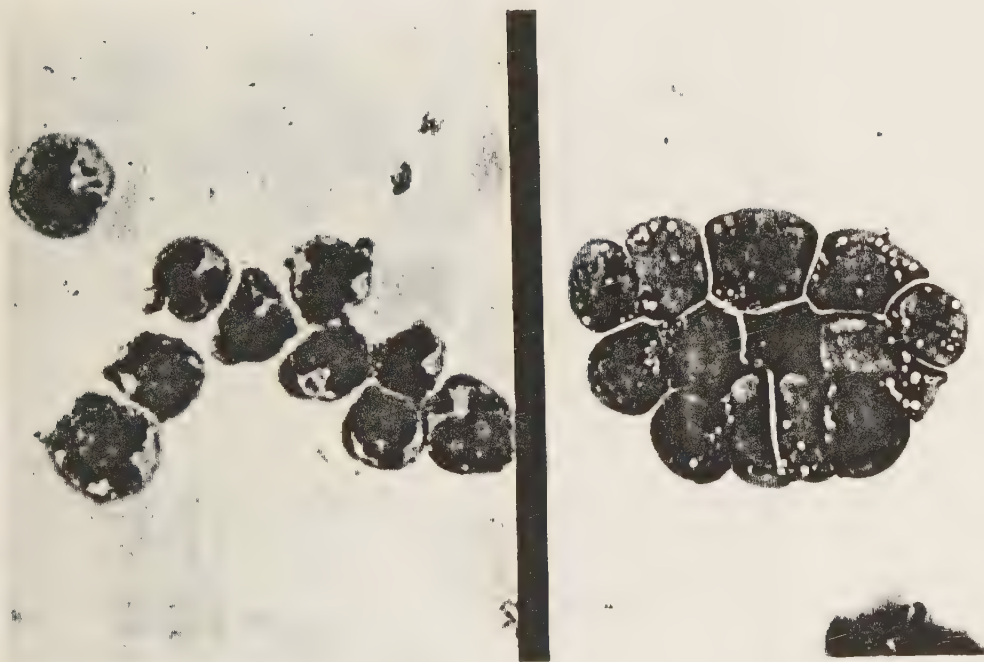
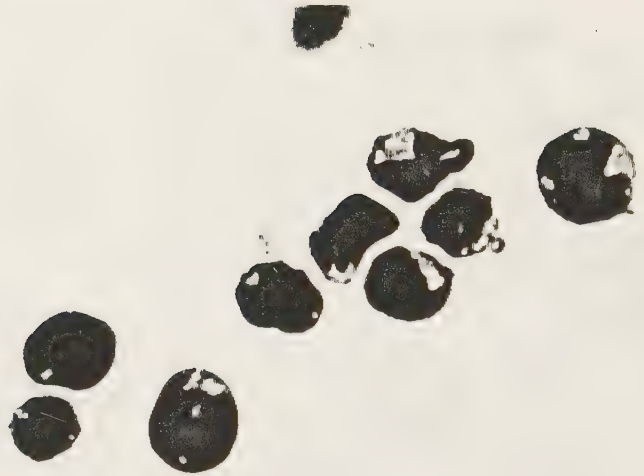


Abbildung 24 Kultivierung von Ewing-Sarcoma-Zellen in 10
ASDCL-Reaktion

a) am Tag 0

b) am Tag 27

a)



b)



Abbildung 25 Kultivierung von Walm-6M1-Zellen in DC:
Zellmorphologie

a) am Tag 0

b) am Tag 27

Bei der Kultivierung von Zellen der Reh-Zell-Linie in DC wurden 27% ASDCL-positive Zellen zum Tag 9 der Kulturperiode gefunden. 1-4% der Zellen zeigten Morphologie und Zytochemie von Makrophagen zum Tag 6 und 13 der Kulturperiode, die übrigen Zellen behielten ihr blastenähnliches Aussehen.

Die Pronasevorbehandlung hatte keinen Einfluß auf die Expression von cALLA, Granulozyten-spezifischem und Monozyten-spezifischem Antigen.

Die mit FITC-konjugiertem Mäuse-Aszites als Kontrolle durchgeführten Experimente zeigten keine unspezifische Färbung der Zellen.

5 Mögliche Reservoirs für die Entwicklung von granulozytären Zellen und Makrophagen während der Kultivierung von Zellen akuter lymphoblastischer Leukämien vom common-Typ in Diffusionskammern

Aufgrund der Ergebnisse wird deutlich, daß mononukleäre Blutzellen von Patienten mit cALL unter den Stimulationsbedingungen der DC in die granulozytäre Reihe differenzieren können. Dabei übertreffen sie am Tag 20 der Kulturperiode prozentual wie auch absolut die granulopoetische Differenzierung bei normalen Probanden. Die Anzahl der leukämischen Blasten sinkt umgekehrt proportional im Verlauf der Kultur auf ein Minimum ab. Eine Abhängigkeit der zum Tag 20 entstandenen Granulopoese von hämatopoetischen Vorläuferzellen, den granulopoetisch determinierten CFU-C und den unreiferen CFU-DG läßt sich dabei nicht nachweisen. Im Gegensatz zur CFU-C, die im peripheren Blut von cALL-Patienten gegenüber hämatologisch Gesunden erhöht ist, stimmt die Anzahl der CFU-DG bei beiden, cALL-Patienten und hämatologisch Gesunden, überein. Dagegen war bei der Klonierung mononukleärer Blutzellen mit der CFU-DG-Methode die Anzahl der "Cluster", die aus 10-20 Zellen bestehen, bei den Patienten mit cALL gegenüber hämatologisch Gesunden erhöht. Diese "Cluster"-bildenden Zellen stellen zum Teil das Reservoir für die in DC entstandene Granulopoese dar. Ihre Natur ist jedoch unklar. Sie könnten zum einen normale, noch vorhandene Stamm- und Vorläuferzellen sein, die verspätet oder vermindert ausreifen. Es könnte sich jedoch auch um cALL-Blasten mit der Fähigkeit in die granulozytäre Reihe auszu-differenzieren handeln.

5.1 normale Resthämatoopoese

In Stamm- und Vorläuferzellen das Reservoir für die in den DC gebildete Granulopoese zu sehen stützt sich auf die von mehreren Arbeitsgruppen beobachtete Hemmung normaler Vorläuferzellen durch leukämische Zellen oder Faktoren aus dem Serum leukämischer Patienten. Morris et al. (295), Chiyoda et al. (77) und Knudtson et al. (234) zeigten, daß Zellen von Patienten mit akuter Leukämie die Proliferation von normalen CFU-C hemmen können. Broxmeyer et al. (57, 63, 59, 62) und Chiyoda et al. (78) gelang es, aus Blasten oder Serum akuter Leukämien eine auf normale hämatopoetische Vorläuferzellen hemmend wirkende Substanz zu extrahieren. Ein Hemmstoff gegen CFU-C, produziert von einer leukämischen Zell-Linie, der K 562, wurde von Olofsson und Cline (332, 333, 334) beschrieben. Diese Substanz, von Broxmeyer LIA (leukemia cell-derived inhibitory activity) genannt, hemmt den Eintritt normaler GM-CFC in die S-Phase (87). Die Ähnlichkeit der LIA mit den die S-Phase granulozytärer Vorläuferzellen hemmenden sauren Isoferritinen (58, 56) zeigt möglicherweise eine Beteiligung der LIA an einer Störung der normalen negativen "Feed-back"-Regelung der Granulopoese (61, 60). Folglich wäre die mangelnde Ausreifung in die Granulopoese bei ALL-Patienten als Störung der Regulation aufzufassen, welche von den leukämischen Blasten ausgeht. Steinberg und Handler (393) beobachteten, daß Zahl und Größe von Kolonien aus normalem Rattenknochenmark in PCDC bei Kultivierung in leukämischen Tieren im Vergleich zur Kultur in gesunden Tieren vermindert waren. Die durch die vorliegende Arbeit gefundene Vermehrung der Cluster bei leukämischen Patienten könnten in analoger Weise in Zahl und Größe verminderte CFU-DG sein. Dies würde bedeuten, daß bei Kulturbeginn die mehr als 90% des Kammerinhalts betragenden leukämischen Zellen die Vorläuferzellen der normalen Granulopoese hemmen. Mit der Verminderung der leukämischen Blasten im Verlauf der DC-Kultur verringert sich auch die Hemmung auf die normalen Vorläuferzellen.

Dadurch kommt es zu einem verzögerten Ausreifen der CFU-DG. Diese konnte deshalb zum Tag 14 noch nicht erfaßt werden.

Jedoch wird eine Hemmung der Granulopoese durch leukämische Zellen oder durch Serum leukämischer Patienten nicht von allen Arbeitsgruppen bestätigt. Die Arbeitsgruppe von Findley (121, 357, 122) fand bei ALL weder eine von den leukämischen Zellen ausgehende Hemmung der Granulopoese durch Zell-vermittelte Zytotoxizität noch Produktion hemmender Faktoren. Ähnliche Beobachtungen machten Morris et al. (296) bei ALL sowie Robinson et al. (366), Greenberg et al. (155) und Senn et al. (382) bei AML zum Zeitpunkt der Diagnose wie auch im Rückfall.

Für die beobachtete Verminderung der leukämischen Blasten gibt es zwei Möglichkeiten. Zum einen könnte das Diffusionskammermilieu für die leukämischen Blasten ungünstig sein, wodurch diese absterben. Dafür spricht der gegenüber normalen Blutzellen stärkere Zellabfall zu Beginn der ALL-Kultur. Daneben kam es im Gegensatz zu normalen Zellen bei den ALL nur zu einem geringen oder keinem erneuten Zellzahlanstieg während der DC-Kultur. Diese Hypothese wird gestützt durch den, bei In-vitro-Kultivierung in Dexter-Kulturen gefundenen, proliferativen Vorteil der normalen Resthämatoopoese über die leukämischen Blasten (358, 82). Zum anderen könnte die Abnahme der Blastenzahl auch durch Ausdifferenzierung bedingt sein. Lau et al. zeigten, daß cALL-Blasten (253, 252, 403, 206) und die aus leukämischen non-T, non-B Blasten etablierte Reh-Zell-Linie (254) unter den Bedingungen der DC in die B- und T-Zellreihe differenzieren. Steinberg et al. (395) fanden einen Verlust der Hemmung normaler Knochenmarkszellen durch leukämische Zell-Linien, nachdem letztere durch chemische Agentien zur Differenzierung gebracht wurden. Eine Differenzierung der cALL-Blasten in die B- oder T-Zellreihe könnte somit zu einem Wegfall der Hemmung auf die granulopoetischen Vorläuferzellen geführt haben.

5.2 Zellen der akuten lymphoblastischen Leukämie vom common-Typ

Die Hypothese, daß die Zielzelle der malignen Transformation bei der cALL eine frühe Vorläuferzelle mit Differenzierungskapazität in die lymphatische sowie myeloische Reihe sein könnte, geht auf Beobachtungen von Janossy (213, 212, 211, 207) zurück. Sie basiert darauf, daß die CML in lymphoider Blastenkrise den gleichen immunologischen Phänotyp wie die cALL ausprägt. Daneben sprechen beide auf die gleiche Therapie an (213, 71, 237, 236). Ähnlich den cALL-Blasten konnte auch ein Teil der lymphoiden Blastenkrisen der CML durch Immunglobulin-Rearrangements der schweren Ketten einem frühen B-Zell-Vorläuferstadium zugeordnet werden (12). Einige Ph-positive CML-Blastenkrisen exprimieren zytoplasmatisches Immunglobulin (zIg), einen Marker der B-Zelldifferenzierung (149). Aufgrund der Gemeinsamkeiten der cALL und der cALLA-positiven Blastenkrise bei CML kann man annehmen, daß sich die Zellen bei beiden Erkrankungen entwicklungsgeschichtlich in einem ähnlichen Stadium befinden. Als Zielzelle für die maligne Transformation gilt bei der CML aufgrund von Untersuchungen der Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G-6-PD)-Isoenzyme und klonaler Marker die pluripotente Stammzelle (116, 266, 178, 5). Daher ließe sich in Erwägung ziehen, daß möglicherweise auch bei der cALL eine frühe Vorläuferzelle mit pluripotenter Differenzierungskapazität transformiert wird.

Die von uns durchgeführten DC-Kultivierungen der Malm-6-M1- und der Reh-Zell-Linie zeigen, daß aus non-T, non-B ALL etablierte Zell-Linien unter den Stimulationsbedingungen der DC myeloische Differenzierungsmarker ausprägen können.

Die Malm-6-M1-Zell-Linie enthält zIg und prägt das cALLA aus (188). Sie wird daher zur B-Zellreihe gerechnet. Bei den vorliegenden Experimenten wurde die Zugehörigkeit zur B-Zellreihe durch ein auf normalen und malignen B-Lymphozyten

vorkommendes Zelloberflächen-Antigen bestimmt. Daneben prägte die Nalm-6-M1 wie die Reh-Zell-Linie das cALLA aus. Die Anzahl der cALLA-positiven Zellen variierte stark während der DC-Kultivierung bei beiden Zell-Linien. Eine Erklärung dafür könnte sein, daß das cALLA kein integrales Membranprotein ist (312). Das cALLA kommt zusammen mit Immunglobulin-Rearrangements der schweren Ketten, λ g oder T-Zellmarkern bei einer großen Gruppe der ALL vor. Die Einordnung des cALLA als eine charakteristische Eigenschaft von lymphoiden Vorläufern ist jedoch umstritten, da das cALLA auch auf reifen Granulozyten (81, 52) und auf nicht-hämatopoetischen Geweben (285, 69, 342, 399, 347) gefunden wurde.

Während der DC-Kultur der Nalm-6-M1-Zelllinie traten Zellen mit spezifisch auf granulozytären oder monozytären Zellen bzw. Makrophagen vorkommenden Antigenen auf. Daneben wurden bei der Nalm-6-M1-Zell-Linie wie auch bei der Reh-Zell-Linie ASDCL- und NAS-positive Zellen beobachtet. Die NAS-positiven Zellen hatten die Morphologie von Makrophagen. Charakteristisch für normale Monozyten und Makrophagen ist eine Hemmung der NAS-Reaktion durch NaF (257). Diese konnte bei den Nalm-6-M1-Zellen nicht beobachtet werden. Eine Erklärung dafür könnte ein von der normalen Differenzierung abweichendes Verhalten der leukämischen Zellen darstellen. Die ASDCL-Reaktion ist abhängig von unspezifischer Esterase, die normalerweise nur in neutrophilen granulozytären Zellen und Gewebemastzellen vorkommt (258). Neben einer geringen Zahl von zytochemisch durch die ASDCL- und die NAS-Reaktion der myeloischen Zellreihe zugeordneten Zellen konnten Lau et al. (254) bei DC-Kultur der Reh-Zell-Linie eine Differenzierung in die T- und B-Zellreihe zeigen. Das Auftreten von Zellen mit positiver ASDCL- und NAS-Reaktion zusammen mit für granulozytäre Zellen spezifischen Membran-Antigenen bei der ursprünglich der B-Zellreihe zugehörigen Nalm-6-M1-Zell-Linie spricht für eine Differenzierungskapazität in die B-lymphozytäre und myeloische Zellreihe.

Die These des Ursprungs des malignen Klons in einer gemeinsamen Vorläuferzelle für myeloische und lymphozytäre Zellen wird gestützt durch die in vitro durch Phorbol-Ester induzierte Differenzierung der leukämischen non-T, non-B Reh-Zell-Linie in Makrophagen (389). Desweiteren erreichten Boyd und Schrader (42) durch Demethylierung der DNA mit 5-Azacytidin eine Differenzierung von B-Zell-Linien in Makrophagen.

Durch In-vitro-Infektion von Mäuseknochenmark mit, die Onkogene *bas*, *H-ras*, *K-ras*, *src*, *abl* und *fes* enthaltenden Retroviren entstanden transformierte prä-B-Zell-Linien, welche gleichzeitig B-lymphozytäre und myeloische Marker ausprägten (173). In einem Fall von akuter promyeloischer Leukämie, welche gleichzeitig TdT ausprägte, konnte in vitro eine Differenzierung in einen T-lymphozytären/promyelozytären Hybrid-Phänotyp beobachtet werden (338). In der klinischen Literatur wurden eine Reihe biphänotypischer Leukämien beschrieben. Die leukämischen Blasten prägten entweder gleichzeitig (434, 390, 354, 339, 341, 353, 274, 215, 185, 83, 125, 305, 18, 398, 65, 159, 90) oder in zeitlicher Abfolge (262, 413, 189, 164, 166, 264, 391, 167) einen lymphoiden und myeloischen Zelltyp aus. McCulloch interpretierte die Ko-Expression von Markern verschiedener hämatopoetischer Zell-Linien als eine aberrante Ausprägung oder Programmierung der malignen Zellen (387). Greaves et al. (153) beurteilten das Vorkommen von Markern mehrerer Zell-Linien als normale Fähigkeit von bi- oder multipotenten Progenitoren. Diese normalerweise vorübergehende Phase würde dann bei diesen Leukämien durch einen Ausreifungsstopp fixiert. Analog zu diesen beiden Theorien können auch die vorliegenden Ergebnisse interpretiert werden. Wäre die Ausprägung myeloischer Marker bei der Malm-6-M1-Zell-Linie und der Reh-Zell-Linie durch eine aberrante Programmierung der leukämischen Zellen zu erklären, würden die bei Kultivierung mononukleärer Blutzellen von cALL-Patienten in DC gegenüber hämatologisch Gesunden vermehrten granulozytären "Cluster" in der Ausreifung gehemmten normalen CFU-DG entsprechen.

Handelt es sich jedoch um eine normalen Vorläuferzellen entsprechende Fähigkeit, so wäre die Zielzelle für die maligne Transformation bei der cALL eine Vorläuferzelle mit pluripotenter Differenzierungskapazität, die durch die Stimulationsbedingungen der DC zur Ausreifung in die granulocytaire Reihe gebracht werden kann.

Unabhängig davon, welche der beiden Interpretationen zutreffend ist, stellt die DC ein System dar, in dem es bei Kultivierung von peripheren Blutzellen von cALL-Patienten zur Bildung granulocytyärer Zellen kommt. Die daran beteiligten humoralen Faktoren könnten in Zukunft zu einem neuen Therapiekonzept beitragen.

- 1 : Abramson, S., Miller, R. G., Phillips, R. A.
The identification in adult bone marrow of pluripotent and restricted stem cells of the myeloid and lymphoid systems
J. Exp. Med. 145, 1567-1579
1977
- 2 : Adamson, J. W., Fialkow, P. J., Murphy, S., Prchal, J. F., Steinmann, L.
Polycythemia vera. Stem cell and probable clonal origin of the disease
N. Engl. J. Med. 295, 913-916
1976
- 3 : Algire, G. H., Moore, R. O.
Passage of mouse leukemia cells through pores of various sizes in diffusion chambers
Transpl. Bull. 6, 425
1959
- 4 : Algire, G. H., Weaver, J. M., Prehn, R. T.
Growth of cells in vivo in diffusion chambers. I. Survival of homografts in immunized mice
J. Natl. Cancer Inst. 15, 493-507
1954
- 5 : Allouche, M., Bourinbaïar, A., Georgoulas, V., Consolini, R., Salvatore, A., Auclair, H., Jasmin, C.
T cell lineage involvement in lymphoid blast crisis of chronic myeloid leukemia
Blood 66, 1155-1161
1985
- 6 : Amos, D. B., Wakefield, J. D.
Growth of mouse ascites tumor cells in diffusion chambers. I. Studies of growth rate of cells and the rate of entry of antibody
J. Natl. Cancer Inst. 21, 657-670
1958
- 7 : Amos, D. B.
Transplantation of cells and tissues in diffusion chambers
In: Transplantation of tissues and cells
(R. E. Billingham und W. K. Silvers, Eds.), S. 69
Vistar Inst. Press, Philadelphia
1961
- 8 : Antin, J. H., Weinberg, D. S., Rapoport, J. M.
Evidence that pluripotent stem cells form splenic colonies in humans after marrow transplantation
Transplantation 39, 102-105
1985
- 9 : Axelrad, A. A., McLeod, D. L., Shreeve, M. M., Heath, D. S.
Properties of cells that produce erythrocytic colonies in vitro
In: Hemopoiesis in Culture (W. A. Robinson, Ed.), S. 226-234,
DHEW Publication No (NIH) 74-205, Washington
1973

- 10 : Baccarani, M., Tura, S.
Differentiation of myeloid leukemic cells: new possibilities
for therapy
Br. J. Haematol. 42, 485-490
1979
- 11 : Bainton, D. F., Farquhar, M. G.
Origin of granules in polymorphonuclear leukocytes: Two types
derived from opposite faces of the golgi complex in developing
granulocytes
J. Cell. Biol. 28, 277-301
1966
- 12 : Bakhshi, A., Minowada, J., Arnold, A., Cossman, J., Jensen, J.,
Whang-Peng, J., Waldmann, T. A., Korsmeyer, S. J.
Lymphoid blast crisis of chronic myelogenous leukemia represent
stages in the development of B-cell precursors
N. Engl. J. Med. 309, 826-831
1983
- 13 : Barr, R. D., Fialkow, P. J.
Clonal origin of chronic myelocytic leukemia
N. Engl. J. Med. 289, 307-309
1973
- 14 : Barr, R. D., Watt, J.
Preliminary evidence for the common origin of a lympho-myeloid
complex in man
Acta haemat. 60, 29-35
1978
- 15 : Barr, R. D., Whang-Peng, J., Perry, S.
Hemopoietic stem cells in human peripheral blood
Science 190, 284-285
1975
- 16 : Becker, A. J., McCulloch, E. A., Till, J. E.
Cytological demonstration of the clonal nature of spleen
colonies derived from transplanted mouse marrow cells
Nature 197, 452-454
1963
- 17 : Belpomme, D., Mathe, G., Davies, A. J. S.
Clinical significance and prognostic value of the T-B
immunological classification of human primary acute lymphoid
leukaemias
Lancet i, 555
1977
- 18 : Ben-Bassat, I., Gale, R. P.
Hybrid acute leukemia
Leuk. Res. 8, 929-936
1984
- 19 : Ben-Ishay, Z., Prindull, G.
Differential characterization of colony-forming units in
diffusion chambers from pluripotent stem cells and progenitors
of granulocytes/macrophages
Isr. J. Med. Sci. 18, 990
1982

- 20 : Ben-Ishay, Z., Reichert, F., Sharon, S.
Erythroid "bursts" in semi-solid agar diffusion chambers: Effect of cyclophosphamide administration to host and of hydroxyurea to donor animals
Exp. Hemat. 6, 631-635
1978
- 21 : Benestad, H. B.
Cell kinetics in diffusion chambers: Survival, resumption of proliferation and maturation rate of murine haemopoietic cells
Cell Tissue Kinet. 5, 421-431
1972
- 22 : Benestad, H. B., Testa, M. G., Lajtha, L. G.
Inhibition of haemopoietic stem cell proliferation by a diffusible product of bone marrow cells
Scand. J. Haematol. 20, 18-24
1978
- 23 : Benestad, H. B., Reikvam, A.
Diffusion chamber culturing of haematopoietic cells: Methodological investigations and improvement of the technique
Exp. Hemat. 3, 249-260
1975
- 24 : Benestad, H. B., Toogood, E. O.
Diffusion chamber (DC) culturing of haemopoietic cells: a reliable assay system for regulators of proliferation?
Exp. Hematol. 10, 161-171
1982
- 25 : Benestad, H. B.
Formation of granulocytes and macrophages in diffusion chamber cultures of mouse blood leucocytes
Scand. J. Haemat. 7, 279-288
1970
- 26 : Bennett, J. M., Catovsky, D., Daniel, M.-T., Flandrin, G., Galton, D. A. G., Gralnick, H. R., Sultan, C.
Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) cooperative group
Brit. J. Haematol. 33, 451-458
1976
- 27 : Bernheim, A., Berger, R., Preud'Homme, J. L., LaBaume, S., Bussel, A., Bazio-Ciozazu, R.
Philadelphia chromosome positive blood B lymphocytes in chronic myelocytic leukemia
Leuk. Res. 5, 331-339
1981
- 28 : Bettelheim, P., Lutz, D., Majdic, O., Palletta, E., Haas, O., Linkesch, W., Neumann, E., Lechner, K., Knapp, W.
Cell lineage heterogeneity in blast crisis of chronic myeloid leukaemia
Br. J. Haematol. 59, 395-409
1985

- 29 : Bettelheim, P., Paietta, E., Majdic, O., Gadner, H.,
Schwarzmeier, J., Knapp, J.
Expression of a myeloid marker on TdT-positive acute lymphocytic
leukemia cells: Evidence by double-fluorescence staining
Blood 60, 1392-1396
1982
- 30 : Beutler, E., Yeh, M., Fairbanks, V. F.
The normal human as a mosaic of X-Chromosome activity: studies
using the gene for G-6-PD - deficiency as a marker
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48, 9-16
1962
- 31 : Bisceglie, V.
Über die antineoplastische Immunität. II. Mitteilung. Über die
Wachstumsfähigkeit der heterologen Geschwülste in erwachsenen
Tieren nach Einpflanzung in Kollodiumsäckchen
Ztschr. f. Krebsforsch. 40, 141-158
1933
- 32 : Bloomfield, G. D., Peterson, C. C., Yunis, J. J.,
Brunner, R. D.
The Philadelphia Chromosome (Ph) in adults presenting with
acute leukaemia: a comparison of Ph + and Ph - patients
Br. J. Haematol. 36, 347-358
1977
- 33 : Bloomfield, C. D., Lindquist, L. L., Brunner, R. D., Yunis, J.
J., Coccia, P. F.
The Philadelphia Chromosome in acute leukemia
Virchows Archiv B. Cell Path. 29, 81-91
1978
- 34 : Boecker, W. R., Boyum, A., Carsten, A. L., Cronkite, E. P.
Human bone marrow (HBM) and blood (HPB) stem cell kinetics
Blood 38, 819
1971
- 35 : Boecker, W. R., Öhl, S., Hossfeld, D. K., Schmidt, C. G.
Differentiation of Auer-rod positive leukaemic cells in
diffusion chamber culture
Lancet 1, 267-268
1978
- 36 : Boggs, D. R.
Hematopoietic stem cell theory in relation to possible
lymphoblastic conversion of chronic myeloid leukemia
Blood 44, 449-453
1974
- 37 : Boll, I.
Granulozytopenese: Morphologie, Physiologie, Kinetik und
Funktion
In: Handbuch der Inneren Medizin, Bd. II/3, (H. Schwiegk, Ed.),
S. 193, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York
1976

- 38 : Bollum, F. J.
Terminal deoxynucleotidyl transferase as a hematopoietic cell
marker
Blood 54, 1203-1215
1979
- 39 : Bollum, F. J.
Calf thymus polymerase
J. Biol. Chem. 235, 2399-2403
1960
- 40 : Bollum, F. J.
Antibody to terminal deoxynucleotidyl transferase
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 4119-4122
1975
- 41 : Borella, L., Sen, L.
T cell surface markers on lymphoblasts from acute lymphocytic
leukemia
J. Immunol. 11, 1257-1260
1973
- 42 : Boyd, A. W., Schrader, J. W.
Derivation of macrophage-like lines from the pre-B lymphoma ABL
8.1 using 5-azacytidine
Nature 297, 691-693
1982
- 43 : Boyum, A.
Separation of leukocytes from blood and bone marrow
Scan. J. Clin. Lab. Invest. 21, Suppl. 97, 26-109
1968
- 44 : Boyum, A., Borgstrom, R.
The concentration of granulocytic stem cells in mouse bone
marrow, determined with diffusion chamber technique
Scand. J. Haematol. 7, 294-288
1970
- 45 : Boyum, A., Carsten, A. L., Laerum, O. D., Cronkite, E. D.
Kinetics of cell proliferation of murine bone marrow cells
cultured in diffusion chambers: effect of hypoxia, bleeding,
erythropoietin injections, polycythemia, and irradiation of
the host
Blood 40, 174-188
1972
- 46 : Boyum, A., Løvhaug, D., Boecker, W. R.
Regulation of bone marrow cell growth in diffusion chambers: The
effect of adding normal and leukemic (CML) polymorphonuclear
granulocytes
Blood 48, 373-383
1976
- 47 : Boyum, A., Boecker, W., Carsten, A. L., Cronkite, E. P.
Proliferation of human bone marrow cells in diffusion chambers
implanted into normal or irradiated mice
Blood 40, 163-173
1972

- 48 : Brack, C., Hirama, M., Lenhard-Schuller, R., Tonegawa, S.
A complete immunoglobulin gene is created by somatic recombination
Cell 15, 1-14
1978
- 49 : Bradley, T. R., Telfer, P. A., Fry, P.
The effect of erythrocytes on mouse bone marrow colony development in vitro
Blood 38, 353-359
1971
- 50 : Bradley, T. R., Metcalf, D.
The growth of mouse bone marrow in vitro
Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci. 44, 287-299
1966
- 51 : Bradstock, K. F., Hoffbrand, A. V., Ganeshaguru, J. K., Llewellyn, P., Patterson, K., Wonke, B., Prentice, A. G., Bennett, M., Pizzolo, G., Bollum, F. J., Janossy, G.
Terminal deoxynucleotidyl transferase expression non-lymphoid leukemia: An analysis by immunofluorescence
Br. J. Haematol. 47, 133-143
1981
- 52 : Braun, M. P., Martin, P. J., Ledbetter, J. A., Hansen, J. A.
Granulocytes and cultured human fibroblasts express common acute lymphoblastic leukemia-associated antigens
Blood 61, 718-725
1983
- 53 : Breivik, H., Benestad, H. B., Boyum, A.
Diffusion chamber and spleen colony assay of murine haematopoietic stem cells
J. Cell. Physiol. 78, 65-72
1971
- 54 : Brouet, J. C., Toben, H. R., Chevalier, A., Seligmann, M.
T and B membrane markers on blast cells in 69 patients with acute lymphoblastic leukemia
Ann. Immunol. (Inst. Past.) 125c, 691-696
1974
- 55 : Brown, G., Greaves, M. F., Lister, T. A., Rapson, N., Papamichael, M.
Expression of human T and B lymphocyte cell surface markers on leukemic cells
Lancet 2, 753-755
1974
- 56 : Broxmeyer, H. E., Baker, F. L., Galbraith P. R.
In vitro regulation of granulopoiesis in human leukemia: Application of an assay for colony-inhibiting cells
Blood 47, 389-402
1976

- 57 : Broxmeyer, H. E., Bognacki, J., Ralph, P., Dorner, M. H., Lu, L., Castro-Malaspina, H.
Monocyte-macrophage derived acidic isoferritins: normal feedback regulators of granulocyte-macrophage progenitor cells
Blood 60, 595-607
1982
- 58 : Broxmeyer, H. E.
Acid isoferritin inhibitory activity
Blood 62, 702-703
1983
- 59 : Broxmeyer, H. E., Jacobsen, N., Kurland, J., Mendelsohn, N., Moore, M. A. S.
In vitro suppression of normal granulocytic stem cells by inhibitory activity derived from human leukemia cells
J. Natl. Cancer Inst. 60, 497-511
1978
- 60 : Broxmeyer, H. E., Bognacki, J., Dorner, M. H., de Sousa, M.
Identification of leukemia-associated inhibitory activity as acidic isoferritin. A regulatory role for acidic isoferritin in the production of granulocytes and macrophages
J. Exp. Med. 153, 1426-1444
1981
- 61 : Broxmeyer, H. E., Ralph, P., Margolis, V. B., Nakoinz, I., Meyers, P., Kapoor, N., Moore, M. A. S.
Characteristics of bone marrow and blood cells in human leukemia that produce leukemia inhibitory activity (LIA)
Leuk. Res. 3, 193-203
1979
- 62 : Broxmeyer, H. E., Gentile, P., Bognacki, J., Ralph, P.
Lactoferrin, transferrin and acidic isoferritins: regulatory molecules with potential therapeutic value in leukemia
Blood cells 9, 83-105
1983
- 63 : Broxmeyer, H. E., Grossbard, E., Jacobsen, N., Moore, M. A. S.
Evidence for a proliferative advantage of human leukemia colony-forming cells in vitro
J. Natl. Cancer Inst. 60, 513-521
1978
- 64 : Burgess, A. W., Nicola, N. A.
Growth factors and stem cells
Academic press, Sydney-New York-London-Paris-San Diego-San Francisco-Sao Paulo-Tokyo-Toronto
1983
- 65 : Campana, D., Norton, J. D., Janosy, G., Prentice, H. G., Hoffbrand, A. V.
T-cell antigen and/or TdI positive acute myeloblastic leukaemias: studies on Ig and T-cell antigen receptor gene rearrangements
Br. J. Haematol. 64, 832-833
1986

- 66 : Canellos, G. P., DeVita, W. T., Whang-Peng, J., Carbone, P. P.
Hematologic and cytogenetic remission of blastic transformation
in chronic granulocytic leukemia.
Blood 38, 671-679
1971
- 67 : Capalbo, E. E., Albright, J. F., Bennett, W. E.
Evaluation of the diffusion chamber culture technique for
study of the morphological and functional characteristics
of lymphoid cells during antibody production
J. Immunol. 92, 243-251
1964
- 68 : Carrel, S., Schmidt-Kessen, A., Mach, J-P., Heumann, D.,
Girardet, C.
Expression of common acute lymphoblastic leukemia antigen (CALLA)
on human malignant melanoma cell lines
J. Immunol. 130, 2456-2460
1983
- 69 : Carrel, S., Gross, W., Heumann, D., Sekaly, R. P., Girardet, C.,
Schmidt-Kessen, A., Mach, J. P.
Monoclonal antibodies against a "pan-T cell" antigen expressed
thymocytes, peripheral T-lymphocytes and T-cell leukemias
Mol. Immunol. 21, 831-840
1984
- 70 : Castaigne, S., Daniel, M. T., Tilly, H., Herait, P., Degos, L.
Does treatment with Ara-C in low dosage cause differentiation
of leukemic cells?
Blood 62, 85-86
1983
- 71 : Catovsky, D., Tavares de Castro, J.
The classification of acute leukaemia (AL) and its clinical
significance
Schweiz. med. Wschr. 113, 1434-1437
1983
- 72 : Catovsky, D.
Ph⁺-positive acute leukaemia and chronic granulocytic leukaemia:
One or two diseases?
Br. J. Haematol. 42, 493-498
1979
- 73 : Cazzola, M., Cherièrè Lignière, E. L., Gorini, M., Montecucco,
C. M., Riccardi, A., Ascarì, E.
Treatment of acute myeloid leukemia with low dose cytosine
arabioside
3rd International Symposium on Therapy of Acute Leukemias. Rome,
Italy, S. 322
1982
- 74 : Chervenick, P. A., LoBuglio, A. F.
Human blood monocytes: Stimulation of granulocyte and
mononuclear colony formation in vitro
Science 178, 164-166
1972

- 75 : Chervenick, P. A., Boggs, D. R.
In vitro growth of granulocytic and mononuclear cell colonies
from blood of normal individuals
Blood 37, 131-135
1971
- 76 : Chikappa, G., Carsten, A. L., Chanana, A. D., Cronkite, E. P.
Culture of normal human blood cells in diffusion chamber
systems. I. Granulocyte survival and proliferation
Exp. Hemat. 6, 28-36
1978
- 77 : Chiyoda, S., Mizoguchi, H., Asano, S., Takaku, F., Miura, Y.
Influence of leukaemic cells on the colony formation of human
bone marrow cells in vitro II. Suppressive effects of leukaemic
cell extracts
Br. J. Cancer 33, 379-384
1976
- 78 : Chiyoda, S., Mizoguchi, H., Kosaka, K., Takaku, F., Miura, Y.
Influence of leukaemic cells on the colony formation of human
bone marrow cells in vitro
Br. J. Cancer 31, 355-358
1975
- 79 : Coleman, M. S., Hutton, J. J., Simone, P., Bollum, F. J.
Terminal deoxynucleotidyl transferase in human leukemia
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71, 4404-4408
1974
- 80 : Cooper, M. D., Saligmann, M.
B and T lymphocytes in immunodeficiency and in
lymphoproliferative disease
In: B and T cells in immune recognition (F. Loor, G. Roelants,
Eds.), S. 377-405, Wiley, Chichester
1977
- 81 : Cossman, J., Neckers, L. M., Leonard, W. J., Greene, W. C.
Polymorphonuclear neutrophils express the common acute
lymphoblastic leukemia antigen
J. Exp. Med. 157, 1064-1069
1983
- 82 : Coulombel, L., Kalousek, D. K., Eaves, C. J., Gupta, C. M.,
Eaves, A. C.
Long-term marrow culture reveals chromosomally normal
hematopoietic progenitor cells in patients with Philadelphia
chromosome-positive chronic myelogenous leukemia
N. Engl. J. Med. 308, 1493-1498
1983
- 83 : Creutzig, U., Eschenbach, C., Ritter, J., Schellong, G.
Akute Leukämie bei einem 13jährigen Jungen mit gleichzeitigem
Aufreten von Lymphoblasten und Monoblasten
Klin. Pädiat. 193, 162-164
1981

- 84 : Cronkite, E. P., Boecker, W., Carsten, A. L., Chikkappa, G., Joel, D., Laissue, J., Öhl, S.
The use of diffusion chamber cultures in the study of normal and leukemic cell proliferation in man
In: Hemopoiesis in culture (R. Robinson, Ed.), S. 185-199
1973
- 85 : Cronkite, E. P.
Erythropoiesis in plasma clot diffusion chamber (PCDC) culture
In: Diffusion chamber culture. Hemopoiesis, cloning of tumors, cytogenetic and carcinogenic assays (E. Cronkite, A. Carsten, Eds.), S. 259-262, Springer Verlag, Berlin
1980
- 86 : Cronkite, E. P., Carsten, A. L., Chikkappa, G., Laissue, J. A., Öhl, S.
Culture of normal and leukemic cells in diffusion chambers
Adv. Biosciences 14, 273-286
1973
- 87 : Cukrova, V., Hrkál, Z., Kopřivová, H., Neuwirt, J.
Identification of leukemia cell-derived inhibitory activity (LiA) in conditioned medium from human myeloid leukemic cell line ML-2
Blut 52, 51-58
1986
- 88 : Curry, J. L., Trentin, J. J.
Hemopoietic spleen colony studies: I. Growth and differentiation
Dev. Biol. 15, 395-413
1967
- 89 : Cuttner, J., Seremetis, S., Najfeld, V., Dimitriu-Bona, A., Winchester, R. A.
TdT-positive acute leukemia with monocytoid characteristics: Clinical, cytochemical, cytogenetic and immunologic findings
Blood 64, 237-243
1984
- 90 : Dastugue, M., Kuhlein, E., Duchayne, E., Roubinet, F., Bourrouillou, G., Attal, M., Prís, J., Colombies, P.
t(14;14)(q11;q32) in biphenotypic blastic phase of chronic myeloid leukemia
Blood 68, 949-953
1986
- 91 : Davies, A. R., Schmitt, R. G.
Auer bodies in mature neutrophils
J. Amer. med. Ass. 203, 895
1968
- 92 : Delia, D., Cattoretti, G., Bonati, A., Villa, S., De Braud, F., Buscaglia, M.
Detection of the common acute lymphoblastic leukaemia antigen (CALLA) on B cells from human fetal tissues. A multiple phenotypic characterization
Clin. exp. Immunol. 59, 305-314
1985

- 93 : Delia, D., Costa, A., Giardini, R., Del Bino, G., Silvestrini, R., Zola, H.
Surface phenotype and cell kinetics in leukaemias and lymphomas
In: Leukocyte Typing (A. Bernard, L. Boumsell, J. Daussett, C. Milstein und S. F. Schlossman, Eds.), S. 579, Springer Verlag, Berlin
1984
- 94 : Denburg, J. A., Telizyn, S., Messner, H., Jamal, B. L. M., Ackerman, S., Gleich, G. J., Bienenstock, J.
Heterogeneity of human peripheral blood eosinophil-type colonies: Evidence for a common basophil-eosinophil progenitor
Blood 66, 312-318
1985
- 95 : Denburg, J. A., Messner, H., Lim, Bing., Jamal, M., Telizyn, S.
Clonal origin of human basophil/mast cells from circulating multipotent hemopoietic progenitors
Exp. Hematol. 13, 185-188
1985
- 96 : Dexter, T. M., Allen, T. D., Testa, M. G., Scolnick, E.
Friend disease in vitro
J. Exp. Med. 154, 594-608
1981
- 97 : Dexter, T. M., Spooncer, E., Toksoz, D., Lajtha, L. G.
The role of cells and their products in the regulation of in vitro stem cell proliferation and granulocyte development
J. Supramol. Struct. 13, 513-524
1980
- 98 : Dexter, T. M., Allen, T. D., Lajtha, L. G.
Conditions controlling the proliferation of haemopoietic stem cells in vitro
J. Cell. Physiol. 91, 335-344
1977
- 99 : Dexter, T. M., Testa, M. G., Allen, T. D., Rutherford, T., Scolnik, E.
Molecular and cell biological aspects of erythropoiesis in long-term bone marrow cultures
Blood 58, 699-707
1981
- 100 : Dexter, T. M., Garland, J., Scott, D., Scolnick, E., Metcalf, D.
Growth of factor-dependent hemopoietic precursor cell lines
J. Exp. Med. 152, 1036-1047
1980
- 101 : Dimitriu-Bona, A., Burmester, G. R., Waters, S. J., Winchester, R. J.
Human mononuclear phagocyte differentiation antigens.
I. Patterns of antigenic expression on the surface of human monocytes and macrophages defined by monoclonal antibodies
J. Immunol. 130, 145-152
1983

- 102 : Doukas, M. A., Niskanen, E. O., Quesenberry, P. J.
Lithium stimulation of granulopoiesis in diffusion chambers-
a model of a humoral, indirect stimulation of stem cell
proliferation
Blood 65, 163-168
1985
- 103 : Dow, L. W., Martin, P., Moehr, J., Greenberg, M., Macdougall,
L. G., Najfeld, V., Fialkow, P. J.
Evidence for clonal development of childhood acute lymphoblastic
leukemia
Blood 66, 902-907
1985
- 104 : Drexler, H. G., Menon, M., Minowada, J.
Incidence of TdT positivity in cases of leukemia and lymphoma
Acta haemat. 75, 12-17
1986
- 105 : Elkon, D., Sabio, H., Pinizzotto, M., Sigurdsson, M.,
Baker, D. G.
Effect of hyperthermia on murine myeloid precursors
Cancer 54, 1973-1976
1984
- 106 : Elmgreen, J., Jacobsen, M., Knudtzon, S.
The effect of syngeneic peripheral blood cells on the formation
of colonies by normal human bone marrow cells in diffusion
chambers in mice
Scand. J. Haematol. 17, 379-387
1976
- 107 : Fauser, A. A., Kanz, L., Löhner, G. W.
Identification of B cells in multilineage hematopoietic colonies
derived from cells of patients with lymphocytic lymphoma
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 883-885
1985
- 108 : Fauser, A. A., Kanz, L., Cooper, B. A., Löhner, G. W.
B cell lineage: Part of the differentiation program of human
pluripotent stem cells
In: Haematology and Blood Transfusion 29, Modern Trends in Human
Leukaemia VI, (R. Nath, R. Gallo, M. Greaves, G. Janka, Eds.),
S. 433-435, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg
1985
- 109 : Fauser, A. A., Neumann, H. A., Löhner, G. W.
Identification of cells with surface antigens usually associated
with T-cells by a monoclonal antibody in colonies of human bone
marrow containing granulocytes, erythroblasts, megakaryocytes
and macrophages
10th Congress of the International Society for Experimental
Hematology, Abstract 286, Exp. Hematol. 9, S. 165
1981
- 110 : Fauser, A. A., Messner, H. A.
Identification of megakaryocytes, macrophages and eosinophils in
colonies of human bone marrow containing neutrophilic
granulocytes and erythroblasts
Blood 53, 1022-1027

- 111 : Fauser, A. A., Löhhr, G. W.
Recloned colonies positive for T-cell associated antigens
derived from mixed hemopoietic colonies (CFU-GEMM)
PSEBM 170, 220-224
1982
- 112 : Fauser, A. A., Messner, H. A.
Granuloerythropoietic colonies in human marrow, peripheral blood
and cord blood
Blood 52, 1243-1248
1978
- 113 : Fauser, A. A., Löhhr, G. W.
Myelo-lymphopoietic stem cells in human bone marrow
Blut 45, 151-155
1982
- 114 : Fearon, E. R., Burke, P. J., Schiffer, C. A., Zehnbauser, B. A.,
Vogelstein, B.
Differentiation of leukemia cells to polymorphonuclear leukocy-
tes in patients with acute nonlymphocytic leukemia
N. Engl. J. Med. 315, 15-24
1986
- 115 : Ferraris, A. M., Raskind, W. H., Bjornson, B., Jacobsen, R. J.,
Singer, J. W., Fialkow, P. J.
Heterogeneity of B-cell involvement in acute nonlymphocytic
leukemia
Blood 66, 342-344
1985
- 116 : Fialkow, P. J., Jacobson, R. J., Papayannopoulou, Th.
Chronic Myelocytic Leukemia: Clonal origin in a stem cell common
to the granulocyte, erythrocyte, platelet and monocyte /
macrophage
Am. J. Med. 63, 125-130
1977
- 117 : Fialkow, P. J., Singer, J. W.
Tracing development and cell lineages in human hemopoietic
neoplasia
In: Leukemia (I. L. Weissman, Ed.), S. 203-222,
Dahlem Konferenzen 1985, Springer Verlag, Berlin
1985
- 118 : Fialkow, P. J., Martin, P. J., Majfeld, V., Penfold, G. K.,
Jacobson, R. J., Hansen, J. A.
Evidence for a multistep pathogenesis of chronic myelogenous
leukemia
Blood 58, 158-163
1981
- 119 : Fialkow, P.
Cell lineages in hematopoietic neoplasia studied with glucose-6-
phosphat dehydrogenase cell markers
J. Cell. Physiol. Suppl. 1, 37-43
1982

- 120 : Fialkow, P. J., Denman, A. M., Jacobson, R. J., Lowenthal, M. N.
Chronic myelocytic leukemia. Origin of some lymphocytes from
leukemic stem cells
J. Clin. Invest. 62, 815-823
1978
- 121 : Findley, H. W., Kennedy, M. S., Lui, V. K-S., Ragab, A. H.
The effect of leukemic serum on normal granulopoiesis
Exp. Hemat. 7, 259-263
1979
- 122 : Findley, H. W., Jr., Kennedy, M. S., Lui, V. K-S., Ragab, A. H.
The effect of leukemic lymphoblasts on normal granulopoiesis
Exp. Hemat. 7, 495-499
1979
- 123 : Fontebuoni, A., Izzi, T., Lucarelli, G.
Growth patterns of human acute lymphoblastic leukemia
in diffusion chambers before treatment and after cessation
of therapy
Scand. J. Haematol. 24, 199-204
1980
- 124 : Foon, K. A., Schroff, R. W., Gale, R. P.
Surface markers on leukemia and lymphoma cells: Recent advances
Blood 60, 1-19
1982
- 125 : Fradera, J., Velez-Garcia, E., White, J. G.
Acute lymphoblastic leukemia with unusual cytoplasmic
granulation: A morphologic, cytochemical, and ultrastructural
study
Blood 68, 406-411
1986
- 126 : Franklin, K. W., Moloney, W. C., Greenberger, J. S.
Suppression of granulopoiesis in diffusion chambers by syngeneic
clonal acute myelogenous leukemia cells or peritoneal exudate
macrophages
Acta haemat. 61, 317-324
1979
- 127 : Frindel, E., Guigon, M.
Inhibition of CFU entry into cycle by a bone marrow extract
Exp. Hemat. 5, 74-76
1977
- 128 : Frindel, E.
In: Cell Lineage, Stem Cells and Cell Determination (N. Le
Douarin, Ed.), INSERM Symp. 10, S. 227-239, Elsevier/North
Holland Biomedical Press
1979
- 129 : Frindel, E., Croizat, H., Vassort, F.
Stimulating factors liberated by treated bone marrow: in vivo
effect on CFU kinetics
Exp. Hemat. 4, 56-61
1976

- 130 : Fu, S. M., Winchester, R. J., Kunkel, H. G.
The occurrence of the Hl-B alloantigens on the cells of
unclassified acute lymphoblastic leukemias
J. Exp. Med. 142, 1334-1338
1975
- 131 : Gajl-Peczalska, K. J., Bloomfield, C. D., Nesbit, M. E., Kersey,
J. H.
B-cell markers on lymphoblasts in acute lymphoblastic leukaemia
Clin. exp. Immunol. 17, 561-569
1974
- 132 : Ganser, A., Hölzer, D.
Growth kinetics of CFU-GEMM, BFU-E, and CFU-C in diffusion-
chamber cultures of normal human bone marrow cells
Exp. Hematol. 12, 712-716
1984
- 133 : Gathings W. E., Lawton, A. R., Cooper, M. D.
Immunofluorescent studies of the development of pre-B cell,
B lymphocytes and immunoglobulin isotype diversity in humans
Eur. J. Immunol. 7, 804-810
1977
- 134 : Golde, D. W., Cline, M. J.
Identification of the colony-stimulating cell in human
peripheral blood
Clin. Invest. 51, 2981-2983
1972
- 135 : Goldman, M.
Fluorescent antibody methods
Academic Press, New York-London
1968
- 136 : Gordon, M. Y., Blackett, M. M., Douglas, I. D. C.
Colony formation by human haemopoietic precursor cells
cultured in semi-solid agar in diffusion chambers
Brit. J. Haematol. 31, 103-110
1975
- 137 : Gordon, M. Y., Blackett, M. M.
Stimulation of granulocytic colony formation in agar diffusion
chambers implanted in cyclophosphamide pretreated mice
Brit. J. Cancer 32, 51-59
1975
- 138 : Gordon, M. Y., Douglas, I. D. C., Clink, H. M., Pickering, B. M.
J.
Distribution of granulopoietic activity in the human skeleton,
studied by colony growth in agar diffusion chambers
Brit. J. Haematol. 32, 537-542
1976
- 139 : Gordon, M. Y., Okell, S. F., Blackett, M. M.
Comparative studies of humoral factors stimulating
granulopoiesis in agar in vitro and in diffusion chambers
J. Lab. clin. Med. 90, 883-890
1977

- 140 : Gordon, M. Y.
Quantitation of haemopoietic cells from normal and leukaemic RFM mice using an in vivo colony assay
Br. J. Cancer 30, 421-428
1974
- 141 : Greaves, M. F., Janossy, G., Peto, J., Kay, H.
Immunologically defined subclasses of acute lymphoblastic leukaemia in children: their relationship to presentation features and prognosis
Br. J. Haematol. 48, 179-197
1981
- 142 : Greaves, M. F., Delia, D., Janossy, G., Rapson, N., Chessels, J. Woods, M., Prentice, G.
Acute lymphoblastic leukemia associated antigen. IV. Expression on non-leukaemic "lymphoid cells"
Leuk. Res. 4, 15-32
1980
- 143 : Greaves, M. F., Verbi, W., Reeves, B. R., Hoffbrand, A. V., Drysdale, H. C., Jones, C., Sacker, L. S., Samaratunga, J.
"Pre-B" phenotypes in blast crisis of Ph positive CML: Evidence for a pluripotential stem cell "target"
Leuk. Res. 3, 181-191
1979
- 144 : Greaves, M. F., Chan, L. C., Furley, A. J. W., Watt, S. M., Molgaard, H. V.
Lineage promiscuity in hemopoietic differentiation and leukemia
Blood 67, 1-11
1986
- 145 : Greaves, M. F.
Analysis of the clinical and biological significance of lymphoid phenotypes in acute leukaemia
Cancer Res. 41, 4752-4760
1981
- 146 : Greaves, M. F., Lister, T. A.
Prognostic importance of immunologic markers in adult lymphoblastic leukaemia (Letter)
N. Engl. J. Med. 104, 119-120
1981
- 147 : Greaves, M. F.
Tumour markers, phenotypes and maturation arrest in malignancy: A cell selection hypothesis
In: Tumour Markers (E. Boelsma und P. Rümke, Eds.), S. 201-211, A. R. Liss, Inc., New York
1979
- 148 : Greaves, M. F., Janossy, G., Roberts, M., Rapson, N. T., Ellis, R. B., Chessels, J., Lister, T. A., Catovsky, D.
Membrane phenotyping: Diagnosis, monitoring and classification of acute "lymphoid" leukemias
In: Immunological Diagnosis of Leukemias and Lymphomas (S. Thierfelder, H. Rodt und E. Thiel, Eds.), S. 61-75, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York
1982

- 149 : Greaves, M. F., Brown, G., Rapson, N. T., Lister, T. A.
Antisera to acute lymphoblastic leukemia cells
Clin. Immunol. Immunopathol. 4, 67
1975
- 150 : Greaves, M. F., Hariri, G., Newman, R. A., Sutherland, D. R.,
Ritter, M. A., Ritz, J.
Selective expression of the common acute lymphoblastic leukemia
(gp 100) antigen on immature lymphoid cells and their malignant
counterparts
Blood 61, 628-639
1983
- 151 : Greaves, M. F.
Monoclonal antibodies as probes for leukaemic heterogeneity
and haemopoietic differentiation
In: Leukemia Markers (W. Knapp, Ed.), S. 19, Academic Press,
London-New York-Toronto-Sydney-San Francisco
1981
- 152 : Greaves, M. F., Janossy, G.
Patterns of gene expression and the cellular origin of human
leukaemias
Biochim. Biophys. Acta 516, 193-230
1978
- 153 : Greaves, M. F.
Cell surface characteristics of human leukaemic cells
In: Essays in Biochemistry (P. N. Campbell und R. D. Marshall,
Eds.), Vol. 15, S. 78-124, Academic Press, London
1979
- 154 : Greenberger, J. S., Eckner, R. J., Ostertag, W., Colletta, G.,
Boschetti, S., Nagasawa, M., Karpas, A., Weichselbaum, R. R.,
Moloney, W. C.
Release of spleen focus-forming virus (SFFV) from
differentiation inducible promyelocytic leukemia cell lines
transformed in vitro by Friend leukemia virus
Virology 105, 425-435
1980
- 155 : Greenberger, J. S., Newburger, P. E., Lipton, J. M., Moloney,
W. C., Sakakeeny, M. A., Jackson, P. L.
Virus and cell requirements for Friend virus granulocytic
leukemogenesis in long-term bone marrow cultures of NIH swiss
(N:NIH(S)) mice
J. Natl. Cancer Inst. 64, 867-878
1980
- 156 : Greenberger, J. S., Hoffman, N., Lieberman, M., Botnick, L. E.,
Sakakeeny, M. A., Eckner, R. J.
Pool size of pluripotential hematopoietic stem cells increased
in continuous bone marrow culture by Friend spleen focus-forming
virus
J. Natl. Cancer Inst. 70, 323-331
1983

- 157 : Greenberg, P. L., Nichols, W. C., Schrier, S. L.
Granulopoiesis in acute myeloid leukemia and preleukemia
N. Engl. J. Med. 284, 1225-1232
1971
- 158 : Greenberger, J. S., Wroble, L. M., Sakakeeny, M. A.
Murine leukemia viruses: induction of macrophage production of
granulocyte-macrophage colony stimulating factor in vitro
J. Natl. Cancer Inst. 65, 841-851
1980
- 159 : Gressler, V., Garbrecht, M., Hossfeld, D. K.
Occurrence of the common acute lymphoblastic leukemia antigen
on blast cells of a patient with chronic myelomonocytic leukemia
in non-lymphoid blastic phase
Blood 66, 1482-1484
1985
- 160 : Grigoriu, G., Antonescu, M., Iercan, E.
Evidence for a circulating stem cell: newly formed erythroblasts
found in autologous leukocyte-filled diffusion chambers inserted
into bled rabbits
Blood 37, 187-195
1971
- 161 : Guigon, M., Enouf, J., Frindel, E.
Effects of CFU-S inhibitors on murine bone marrow during ARA-C
treatment. I. Effects on stem cells
Leuk. Res. 4, 385-391
1980
- 162 : Hara, H.
Presence of cells in B-cell lineage in mixed (GEMM) colonies
from murine bone marrow cells
Int. J. Cell Cloning 1, 171-181
1983
- 163 : Haskill, J. S., McNeill, T. A., Moore, M. A. S.
Density distribution analysis of in vivo and in vitro colony
forming cells in bone marrow
J. Cell. Physiol. 75, 167-179
1970
- 164 : Hehlmann, R., Zönnchen, B., Thiel, E., Walter, B.
Idiopathic refractory sideroachrestic anemia (IRSA) progressing
to acute mixed lymphoblastic - myelomonoblastic leukemia
Blut 46, 11-21
1983
- 165 : Heit, W., Kern, P., Kubanek, B., Heimpel, H.
Some factors influencing granulocytic colony formation
in vitro by human white blood cells
Blood 44, 511-515
1974
- 166 : Herrmann, R., Han, T., Barcos, M. P., Lok, M. S., Henderson, E.
S.
Malignant lymphoma of pre-T-cell type terminating in acute
myelocytic leukemia
Cancer 46, 1382-1388

- 167 : Hershfield, M. S., Kurtzberg, J., Harden, E., Moore, J. O., Whang-Peng, J., Haynes, B. F.
Conversion of a stem cell leukemia from a T-lymphoid to a myeloid phenotype induced by the adenosine deaminase inhibitor 2'-deoxycytosine
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 253-257
1984
- 168 : Hieter, P. A., Korsmeyer, S. J., Waldmann, T. A., Leder, P.
Human immunoglobulin kappa light-chain genes are deleted or rearranged in lambda-producing B-cells
Nature 290, 368-372
1981
- 169 : Hodgson, G. S., Bradley, T. R.
Properties of haematopoietic stem cells surviving 5-fluorouracil treatment: evidence for a pre-CFU-S cell?
Nature 281, 381-382
1979
- 170 : Hoffbrand, A. V., Ganeshaguru, K., Janossy, G., Greaves, M. F., Catovsky, D., Woodruff, R. K.
Terminal deoxynucleotidyl-transferase levels and membrane phenotypes in diagnosis of acute leukemia
Lancet ii, 520-523
1977
- 171 : Hogeman, P. H. G., Veerman, A. J. P., Van Zantwijk, C. H., Huismans, D. R.
Peanut agglutinin distinguishes CALLA positive reactive bone marrow cells from leukaemic blasts (letter)
Br. J. Haematol. 59, 392-394
1985
- 172 : Hokland, P., Nadler, L. M., Griffin, J. D., Schlossman, S. F., Ritz, J.
Purification of common acute lymphoblastic leukemia antigen positive cells from normal human bone marrow
Blood 64, 662-666
1984
- 173 : Holmes, K. L., Pierce, J. H., Davidson, W. F., Morse, H. C.
Murine haematopoietic cells with pre-B or pre-B/myeloid characteristics are generated by in vitro transformation with retroviruses containing *fes*, *ras*, *abl*, and *src* oncogenes
J. Exp. Med. 164, 443-457
1986
- 174 : Hölzer, D., Kurrle, E., Schmücker, H., Harris, E. B.
Evidence for differentiation of human leukemic blood cells in diffusion chamber culture
Blood 49, 729-743
1977
- 175 : Hölzer, D., Hellriegel, K. P., Schmücker, H., Kurrle, E.
Differenzierungspotenz peripherer Blutzellen von Patienten mit akuter Leukämie
Blut 34, 371-375
1977

- 176 : Hölzer, D., Kurrle, E., Ertl, U., Milewski, A.
Growth of human leukaemic peripheral blood cells in
diffusion chambers
Eur. J. Cancer 10, 579-589
1974
- 177 : Hölzer, D., Fliedner, T. M.
Studies on the regulation of leukemic cell production in human
acute leukemia
Blood cells 3, 519-533
1977
- 178 : Hölzer, D., Ganzer, A., Anger, B., Seifried, E., Heimpel, H.
Low-dose ara-c in the treatment of acute leukemia cytotoxicity
or differentiation induction?
Blut 48, 233-238
1984
- 179 : Hölzer, D., Harris, E. B., Kurrle, E.
Prognostic indications of diffusion chamber and agar culture
studies in human acute leukaemia
Adv. Biosciences 14, 287-297
1973
- 180 : Hölzer, D., Harris, E. B., Slade, M., Kurrle, E.
Growth of in vitro colony-forming cells from normal human
peripheral blood leukocytes cultured in diffusion chambers
J. Cell. Physiol. 89, 89-100
1976
- 181 : Hölzer, D., Schmücker, H., Kurrle, E.
Re-entry of resting leukaemic blood cells into proliferation in
human acute leukaemia during diffusion chamber culture
Blood 33, 301-311
1976
- 182 : Hossfeld, D. K., Weh, H.-J., Kleeberg, U. R.
Low-dose cytarabine: chromosomal findings suggesting its
cytostatic as well differentiating effect
Leuk. Res. 9, 329-330
1985
- 183 : Housset, M., Daniel, M. T., Degos, L.
Small doses of Ara-C in the treatment of acute myeloid leukemia:
differentiation of myeloid leukemia cells?
Br. J. Haematol. 51, 125-129
1982
- 184 : Hozumi, M., Tonegawa, S.
Evidence for somatic rearrangement of immunoglobulin genes
coding for variable and constant regions
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 3628-3632
1976
- 185 : Hull, M. T., Griep, J. A.
Mixed leukemia, lymphatic and myelomonocytic
Am. J. Clin. Pathol. 74, 473-475
1980

- 186 : Humphries, R. K., Eaves, A. C., Eaves, C. J.
Self-renewal of hemopoietic stem cells during mixed colony
formation in vitro
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 78, 3629-3633
1981
- 187 : Humphries, R. K., Jacky, P. B., Dill, F. J., Eaves, A. C.,
Eaves, C. J.
CFU-S in individual erythroid colonies derived in vitro from
adult mouse bone marrow
Nature 279, 718-720
1979
- 188 : Hurwitz, R., Hozier, J., LeBien, T., Minowada, J., Gajl-
Peczalska, K., Kubonishi, I., Kersey, J.
Characterization of a leukemic cell line of the pre-B
phenotype
Int. J. Cancer 23, 174-180
1979
- 189 : Hutter, J. J., Hays, T., Rosen, R. C., Shende, A.,
Lanzkowsky, P., Corrigan, J. J.
Myelogenous leukemia evolving during the course of lymphoid
malignancy in children
Am. J. Hemat. 6, 333-341
1979
- 190 : Hutton, J. J., Coleman, M. S.
Terminal deoxynucleotidyl transferase measurements in the
differential diagnosis of adult leukaemias
Br. J. Haematol. 34, 447-456
1976
- 191 : Ichikawa, Y., Pluznik, D. H., Sachs, L.
In vitro control of the development of macrophage and
granulocyte colonies
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 56, 488-495
1966
- 192 : Iscove, N. W., Sieber, F.
Erythroid progenitors in mouse bone marrow detected by
macroscopic colony formation in culture
Exp. Hematol. 3, 32-43
1975
- 193 : Iscove, N. W., Till, J. E., McCulloch, E. A.
The proliferative states of mouse granulopoietic progenitor
cells
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 134, 33-36
1970
- 194 : Izaguirre, C. A., Minden, M. D., Howatson, A. F., McCulloch,
E. A.
Colony formation by normal and malignant human B-lymphocytes
Brit. J. Cancer 42, 430-437
1980

- 195 : Izzi, T., Fontebuoni, A., Lucarelli, G.
Growth and differentiation patterns of human acute non lymphoid leukemia in diffusion chambers before and after treatment
Blut 43, 25-31
1981
- 196 : Jacobsen, N., Broxmeyer, H. E., Winchester, R. J., Moore, M. A. S.
Expression of DR antigens on early human progenitors of neutrophilic and eosinophilic colonies in diffusion chamber (CFUd)
Scand. J. Haematol. 24, 227-233
1980
- 197 : Jacobsen, N., Broxmeyer, H. E., Grossbard, E., Moore, M. A. S.
Diversity of human granulopoietic precursor cells: Separation of cells that form colonies in diffusion chambers (CFU-d) from populations of colony forming cells in vitro (CFU-c) by velocity sedimentation
Blood 52, 221-232
1978
- 198 : Jacobsen, N., Broxmeyer, H. E., Grossbard, E., Moore, M. A. S.
Colony-forming units in diffusion chambers (CFU-d) and colony-forming units in agar culture (CFU-c) obtained from normal human bone marrow: a possible parent-progeny relationship
Cell Tissue Kinet. 12, 213-226
1979
- 199 : Jacobsen, N.
Chamber centrifugation: A harvesting technique for estimation of the growth of human haemopoietic cells in diffusion chambers
Brit. J. Haematol. 29, 171-177
1975
- 200 : Jacobsen, N., Fauerholdt, L.
Quantitative aspects of an in vivo diffusion chamber assay for normal human hemopoietic colony forming units
Exp. Hemat. 5, 171-185
1977
- 201 : Jacobsen, N., Fauerholdt, L.
Human granulocytopenic colonies in diffusion chambers in mice
Growth of colonies and the effect of host irradiation
Scand. J. Haematol. 16, 101-111
1976
- 202 : Jacobsen, N.
Proliferation of diffusion chamber colony-forming units (CFU D) in cultures of normal human bone marrow in diffusion chambers in mice
Blood 49, 415-424
1977
- 203 : Jacobson, N., Killmann, S.-A., Philip, P., Elmgreen, J.
Interaction between normal and acute myeloblastic human bone marrow in diffusion chambers in mice
Exp. Hematol. 4, Suppl., 190
1976

- 204 : Jacobson, R. J., Fialkow, P. J.
Idiopathic myelofibrosis: Stem cell abnormality and probable
neoplastic origin
Clin. Res. 24, 439 A
1976
- 205 : Jäger, G., Lau, B., Pachmann, K., Rodt, H., Netzel, B., Thiel,
E., Kuhn, D., Thierfelder, S., Dörmer, P.
Cell surface differentiation of acute lymphoblastic cALL-type
leukemias in diffusion chambers
Blut 38, 165-168
1979
- 206 : Jäger, G.
A simple test for the terminal deoxynucleotidyl transferase
using the peroxidase - antiperoxidase technique
Blut 42, 259-261
1981
- 207 : Janossy, G., Woodruff, R. K., Paxton, A., Greaves, M. F.,
Capellaro, M. F., Kirk, B., Innes, E. M., Eden, O. B., Lewis,
C., Catovsky, D., Hoffbrand, A. V.
Membrane marker and cell separation studies in Ph - positive
leukemia
Blood 51, 861-877
1978
- 208 : Janossy, G., Hoffbrand, A. V., Greaves, M. F., Ganeshaguru, K.,
Pain, C., Bradstock, K. F., Prentice, H. G., Kay, H. E. M.,
Lister, T. A.
Terminal transferase enzyme assay and immunological membrane
markers in the diagnosis of leukaemia: a multiparameter analysis
of 300 cases
Br. J. Haemat. 44, 221-234
1980
- 209 : Janossy, G., Greaves, M. F., Sutherland, R., Durrant, J.,
Lewis, C.
Comparative analysis of membrane phenotypes in acute lymphoid
leukaemia and in lymphoid blast crisis of chronic myeloid
leukaemia
Leuk. Res. 1, 289-300
1977
- 210 : Janossy, G., Roberts, M., Greaves, M. F.
Target cell in chronic myeloid leukaemia and its relationship to
acute lymphoid leukaemia
Lancet 13, 1058-1061
1976
- 211 : Janossy, G., Greaves, M. F., Revesz, T., Lister, T. A., Roberts,
M., Durrant, J., Kirk, B., Catovsky, D., Beard, M. E. J.
Blast crisis of chronic myeloid leukaemia (CML)
II. Cell surface marker analysis of "lymphoid" and myeloid cases
Br. J. Haematol. 34, 179-192
1976

- 212 : Janossy, G., Thomas, J. A., Bollum, F. J., Granger, S., Pizzolo, G., Bradstock, K. F., Wong, L., McMichael, A., Ganeshaguru, K., Hoffbrand, A. V.
The human microenvironment: An immunohistologic study
J. Immunol. 125, 202-212
1980
- 213 : Janossy, G., Francis, G. E., Capellaro, D., Goldstone, A. H., Greaves, M. F.
Cell sorter analysis of leukemia-associated antigens on human myeloid precursors
Nature 276, 176-178
1978
- 214 : Janossy, G., Bollum, F. J., Bradstock, K. F., McMichael, A., Rapson, M., Greaves, M. F.
Terminal transferase-positive human bone marrow cells exhibit the antigenic phenotype of common acute lymphoblastic leukemia
J. Immunol. 123, 1525-1529
1979
- 215 : Jehn, U., De Bock, R., Haanen, C.
Clinical trial of low-dose Ara-C in the treatment of acute leukemia and myelodysplasia
Blut 48, 255-261
1984
- 216 : Jehn, U., Thiel, E., Baumgart, R.
Auer-Bodies in acute lymphocytic leukemia
Blood 55, 167-168
1980
- 217 : Johnson, G. R.
Factors altering the ability of multipotential hemopoietic colony-forming cells to self-generate or form progenitor cells
Leuk. Res. 7, 655-666
1983
- 218 : Johnson, G. R., Metcalf, D.
Detection of a new type of mouse eosinophil colony by Luxol-Fast-Blue staining
Exp. Hematol. 8, 549-561
1980
- 219 : Johnson, G. R., Metcalf, D.
Pure and mixed erythroid colony formation in vitro stimulated by spleen conditioned medium with no detectable erythropoietin
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74, 3879-3882
1977
- 220 : Johnson, G. R.
Is erythropoiesis an obligatory step in the commitment of multipotential hematopoietic stem cells?
In: Experimental Hematology Today 1981 (Baum, J. J., Ledney, G. D., Khan, A., Eds.), S. 13-20, Karger Verlag, Basel
1981

- 221 : Johnson, L. I., Lo Bue, J., Chan, P. C., Monette, F. C.,
Rubin, A. D., Gordon, A. S., Dameshek, V.
Autoradiographic studies of human lymphocytes cultured in vivo
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 130, 675-679
1969
- 222 : Johnson, G. R., Nicola, M. A.
Characterization of two populations of CFU-S fractionated from
mouse fetal liver by fluorescence-activated cell sorting
J. Cell. Physiol. 118, 45-52
1984
- 223 : Jones, M. H., Borowitz, M. J., Metzgar, R. S.
Characterization and distribution of a 24,000 molecular weight
antigen defined by a monoclonal antibody (DU-ALL-1) elicited to
common acute lymphoblastic leukemia (cALL) cells
Leuk. Res. 6, 449-464
1982
- 224 : Jones-Villeneuve, E. V., Phillips, R. A.
Potentials for lymphoid differentiation by cells from long term
cultures of bone marrow
Exp. Hematol. 8, 65-76
1980
- 225 : Kaplan, J., Inoue, S., Ottenbreit, M. J.
Myeloid colony-forming cells express human B lymphocyte antigens
Nature 271, 458-459
1978
- 226 : Keating, A., Singer, J. W., Killen, P. D., Striker, G. E.,
Salo, A. C., Sanders, J., Thomas, E. D., Thorning, D., Fialkow,
P. J.
Donor origin of the in vitro haematopoietic microenvironment
after marrow transplantation in man
Nature 298, 280-283
1982
- 227 : Keller, G. M., Phillips, R. A.
Detection in vitro of a unique multipotent hemopoietic
progenitor
J. Cell. Physiol. Suppl. 1, 31-36
1982
- 228 : Kersey, J. H., LeBien, T. W., Gajl-Peczalska, K., Nesbit, M.,
Jansen, J., Kung, P., Goldstein, G., Sather, H., Coccia, P.,
Siegel, S., Bleyer, A., Hammond, D.
Acute lymphoblastic leukemia/lymphoma: Cell markers define
phenotypic heterogeneity
In: W. Knapp, Ed., Leukemia Markers, Academic Press, New York
1981
- 229 : Kersey, J. H., Sabad, A., Gajl-Peczalska, K., Hallgren, H. M.
Yunis, E. J., Nesbit, M. E.
Acute lymphoblastic leukemic cells with T (thymus-derived)
lymphocyte markers
Science 182, 1355-1356
1973

- 230 : Kersey, J. H., LeBien, T. W., Abramson, C. S., Newman, R., Greaves, M.
p24: A human leukemia-associated and lymphohemopoietic progenitor cell surface structure identified with monoclonal antibody
J. Exp. Med. 153, 726-731
1981
- 231 : Kitchingman, G. R., Rovigatti, U., Mauer, A. M., Melvin, S., Murphy, S. B., Stass, S.
Rearrangement of immunoglobulin chain genes in T cell acute lymphoblastic leukemia
Blood 65, 725-729
1985
- 232 : Knapp, W., Majdic, O., Bettelheim, P., Lyszka, K.
VIL-A1, a monoclonal antibody reactive with common acute lymphatic leukemia cells
Leuk. Res. 6, 137-147
1982
- 233 : Knapp, W., Majdic, O., Rumpold, H., Bettelheim, P., Kraft, D., Lyszka, K., Förster, O., Lutz, D.
Myeloid differentiation antigens as defined by monoclonal antibodies
In: Leukemia Markers (W. Knapp, Ed.), S. 207, Academic Press, London-New York-Toronto-Sydney-San Francisco
1981
- 234 : Knudtson, S., Mortensen, B. T.
Interaction between normal and leukaemic human cells in agar culture
Scand. J. Haematol. 17, 369-378
1976
- 235 : Koeffler, H. P., Golde, D. W.
Chronic myelogenous leukemia - New concepts (Second of two parts)
N. Engl. J. Med. 304, 1269-1274
1981
- 236 : Koeffler, H. P., Golde, D. W.
Chronic myelogenous leukemia - New concepts (First of two parts)
N. Engl. J. Med. 304, 1201-1209
1981
- 237 : Koeffler, H. P., Niskanen, E., Cline, M., Billing, R., Golde, D.
Human myeloid precursors forming colonies in diffusion chambers expresses the Ia-like antigen
Blood 54, 1188-1191
1979
- 238 : Komada, Y., Peiper, S. C., Melvin, S. L., Metzger, D. W., Tarnowski, B. H., Green, A. A.
A monoclonal antibody (SJ-9A4) to P24 present on common ALLs, neuroblastomas and platelets. I. Characterization and development of a unique radioimmunoassay
Leuk. Res. 7, 487-498
1983

- 239 : Korn, A. P., Henkelman, R. M., Ottensmeyer, F. P., Till, J. E.
Investigations of a stochastic model of haemopoiesis
Exp. Hematol. 1, 362
1973
- 240 : Korsmeyer, S. J., Hieter, P. A., Ravetch, J. V., Poplack, D. G.,
Waldmann, T. A., Leder, P.
Developmental hierarchy of immunoglobulin gene rearrangement in
human leukemic pre-B-cells
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 7096-7100
1981
- 241 : Korsmeyer, S. J., Arnold, A., Bakhshi, A., Ravetch, J. V.,
Siebenlist, U., Hieter, P. A., Sharrow, S. O., LeBien, T. W.,
Kersey, J. H., Poplack, D. G., Leder, P., Waldmann, T. A.
Immunoglobulin gene rearrangement and cell surface antigen
expression in acute lymphocytic leukemias of T cell and B cell
precursor origins
J. Clin. Invest. 71, 301-313
1983
- 242 : Korsmeyer, S. J.
Hierarchy of immunoglobulin gene rearrangements in B-cell
leukemias
In: Molecular genetic analyses of human lymphoid neoplasms:
Immunoglobulin genes and the c-myc oncogene (T. A. Waldmann,
moderator), Ann. Intern. Med. 102, S. 497
1985
- 243 : Kriegler, A. B., Bradley, T. R., Hodgson, G. S., McNiece, J. K.
Identification of the "factor" in erythrocyte lysates which
enhances colony growth in agar cultures
Exp. Hematol. 9, 11-21
1981
- 244 : Kung, P. C., Goldstein, G., Reinherz, E. L., Schlossman, S. F.
Monoclonal antibodies defining distinctive human T-cell surface
antigens
Science 206, 347-349
1979
- 245 : Kurnit, D. M., Matthysse, S., Papayannopoulou, T.,
Stamatoyannopoulos, G.
Stochastic branching model for hemopoietic progenitor cell
differentiation
J. Cell. Physiol. 123, 55-63
1985
- 246 : Kurosawa, Y., von Boehmer, H., Hass, W., Sakano, H., Trauneker,
A., Tonegawa, S.
Identification of segments of immunoglobulin heavy-chain genes
and their rearrangements in T lymphocytes
Nature 290, 565-570
1981
- 247 : Kurrle, E., Hölzer, D., Langhans, J.
Kultivierung von Blutlymphozyten des Menschen in Diffusions-
kammern zum Nachweis der hämopoetischen Stammzelle
Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med. 80, 1505-1507
1974

- 248 : Laerum, O. D., Grüneisen, A., Rajewsky, M. F.
Proliferative properties of malignant cell populations
cultured in intraperitoneal diffusion chambers
Europ. J. Cancer 9, 533-541
1973
- 249 : Lahiri, S. K., van Putten, L. M.
Location of the G-0 phase in the cell cycle of the mouse
hemopoietic spleen colony forming cells
Cell Tissue Kinet. 2, 21-28
1969
- 250 : Laissue, J. A., Chanana, A. D., Cronkite, E. P., Joel, D. D.,
Pavelec, M.
Culture of autologous bone marrow in diffusion chambers: effect
of host irradiation
Blood 45, 417-425
1975
- 251 : Lala, P. K., Johnson, G. R.
Monoclonal origin of B lymphocyte colony forming cells in spleen
colonies formed by multipotential hemopoietic stem cells
J. Exp. Med. 148, 1468-1477
1978
- 252 : Lau, B.
Differenzierungsvermögen und Proliferation von normalen und
malignen Zellen lymphatischen Ursprungs
Habilitationsschrift zur Erlangung des Grades eines habilitierten
Doktors der Medizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München, a) S. 18-27, b) S. 43-46
1982
- 253 : Lau, B., Jäger, G., Thiel, E., Rodt, H., Huhn, D.,
Pachmann, K., Netzel, B., Böning, L., Thierfelder, S.,
Dörmer, P.
Growth of the Reh cell line in diffusion chambers:
evidence for differentiation along the T- and B-cell
pathway
Scand. J. Haemat. 23, 385-392
1979
- 254 : Lau, B., Jäger, G., Thiel, E., Pachmann, K., Rodt, H., Huhn, D.,
Thierfelder, S., Dörmer, P.
Phenotypic changes in acute lymphoblastic leukemia cells of the
common type in diffusion chambers
Leuk. Res. 4, 561-569
1980
- 255 : Leder, P.
The genetics of antibody diversity
Sci. Am. 246, 102-115
1982
- 256 : Lim, B., Jamal, M., Messner, H. A.
G6PD analysis of myeloid and lymphoid cells in multilineage
colonies
Blood (Suppl.) 60, 101
1982

- 257 : Löffler, H.
Unspezifische Esterasen
Acta histochem. Suppl. 9, 67-74
1971
- 258 : Löffler, H.
Zytochemischer Nachweis von unspezifischer Esterase in
Ausstrichen. Beiträge zur Technik und Ergebnisse im
Blutausstrich des Menschen
Klin. Wochenschrift 39, 1220-1227
1961
- 259 : Lord, B. I., Mori, K. J., Wright, E. G.
A stimulator of stem cell proliferation in regenerating bone
marrow
Biomedicine 27, 223-226
1977
- 260 : Lord, B. I., Mori, K. J., Wright, E. G., Lajtha, L. G.
Inhibitor of stem cell proliferation in normal bone marrow
Brit. J. Haematol. 34, 441-445
1976
- 261 : Lotem, J., Sachs, L.
Different blocks in the differentiation of myeloid leukemic
cells
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 3507-3511
1974
- 262 : Madoff, L., Davey, F. R., Gordon, G. B., Dock, N. L.,
Goldberg, J.
The development of acute myelomonocytic leukemia in a patient
with acute lymphocytic leukemia
Cancer 48, 1157-1163
1981
- 263 : Magli, M. C., Iscove, N. N., Odartchenko, N.
The transient nature of early haemopoietic spleen colonies
Nature 295, 527-529
1982
- 264 : Marcus, R. E., Matutes, E., Drysdale, H., Catovsky, D.
Phenotypic conversion of TdT+ adult AML to CALLA+ ALL
Scand. J. Haematol. 35, 343-347
1985
- 265 : Marmor, J. B., Russell, J. L., Miller, A. M., Robinson, S. H.
Modulation of murine granulocyte proliferation in diffusion
chamber cultures
Blood 46, 39-50
1975
- 266 : Martin, P. J., Najfeld, V., Hansen, J. A., Penfold, G. K.,
Jacobson, R. J., Fialkow, P. J.
Involvement of the B-lymphoid system in chronic myelogenous
leukaemia
Nature 287, 49-50
1980

- 267 : McCaffrey, R., Harrison, T. A., Parkman, R., Baltimore, D.
Terminal deoxynucleotidyl transferase activity in human leukemic
cells and in normal thymocytes
N. Engl. J. Med. 292, 775-780
1975
- 268 : McCarthy, J. H., Mandel, T. E., Garson, O. M., Metcalf, D.
The presence of mast cells in agar culture
Exp. Hematol. 8, 562-567
1980
- 269 : McCormack, R. T., Nelson, R. D., LeBien, T. W.
Structure/function studies of the common acute lymphoblastic
leukemia antigen (CALLA/CD10) expressed on human neutrophils
J. Immunol. 137, 1075-1082
1986
- 270 : McCulloch, E. A., Siminovitch, L., Till, J. E.
Spleen-colony formation in anemic mice of genotype WW
Science 144, 844-846
1964
- 271 : McCulloch, E. A., Siminovitch, L., Till, J. E., Russell, E. S.,
Bernstein, S. E.
The cellular basis of the genetically determined hemopoietic
defect in anemic mice of genotype Si-Sid
Blood 26, 399-410
1965
- 272 : McGarry, M. P., Miller, A. M.
Evidence for the humoral stimulation of eosinophil
granulocytopoiesis in in vivo diffusion chambers
Exp. Hemat. 2, 372-379
1974
- 273 : McLeod, D. L., Shreeve, M. M., Axelrad, A. A.
Chromosome marker evidence for the bipotentially of BFU-E
Blood 56, 318-322
1980
- 274 : Mertelsmann, R., Koziner, B., Ralph, P., Filippa, D., McKenzie,
S., Arlin, Z. A., Gee, T. S., Moore, M. A. S., Clarkson, B. D.
Evidence for distinct lymphocytic and monocytic populations in
a patient with Terminal Transferase-positive acute leukemia
Blood 51, 1051-1056
1978
- 275 : Messner, H. A., Izaquirre, C. A., Iamal, N.
Identification of T-lymphocytes in human mixed hemopoietic
colonies
Blood 58, 402-405
1981
- 276 : Messner, H. A., Fauser, A. A., Buick, R., Chang, J. L. A.,
Lepine, J., Curtis, J. C., Senn, J., McCulloch, E. A.
Assessment of human pluripotent hemopoietic progenitors and
leukemic blast forming cells in culture
In: Modern Trends in Human Leukemia IV (R. Neth, R. C. Gallo,
T. Graf, K. Mannweiler, K. Winkler, Eds.), Wilsede, Springer
Verlag, Berlin-Heidelberg, New York

- 277 : Messner, H. A., Fauser, A. A.
Culture studies of human pluripotent hemopoietic progenitors
Blut 41, 327-333
1980
- 278 : Metcalf, D., MacDonald, H. R., Odartchenko, M., Sordat, B.
Growth of mouse megakaryocyte colonies in vitro
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 72, 1744-1748
1975
- 279 : Metcalf, D., Johnson, G. R., Nicola, M. A.
Separation and commitment of hemopoietic stem and progenitor cells
In: Haemopoietic stem cells (S-A. Killmann, E. P. Cronkite und
M. A. Muller-Berat, Eds.), S. 29-38, Munksgaard, Copenhagen
1983
- 280 : Metcalf, D.
The hemopoietic colony stimulating factors
Elsevier Science Publishers BV, Amsterdam
1984
- 281 : Metcalf, D., Johnson, G. R., Mandel, T. E.
Colony formation in agar by multipotential hemopoietic cells
J. Cell. Physiol. 98, 401-420
1979
- 282 : Metcalf, D., Nossal, G. J. V., Warner, M. L., Miller,
J. F. A. P., Mandel, T. E., Layton, J. E., Gutman, G. A.
Growth of B-lymphocyte colonies in vitro
J. Exp. Med. 142, 1534-1549
1975
- 283 : Metcalf, D.
Cortisone action on serum colony-stimulating factor and bone
marrow in vitro colony-forming cells
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 132, 391-394
1969
- 284 : Metschnikoff, E. M.
Sur la lutte des cellules de l'organisme contre l'invasion des
microbes
Ann. l'Inst. Pasteur 1, 321-336
1887
- 285 : Metzgar, R. S., Borrwitz, M. J., Jones, M. H., Dowell, B. L.
Distribution of common acute lymphoblastic leukemia antigen
in nonhematopoietic tissues
J. Exp. Med. 154, 1249-1254
1981
- 286 : Meuret, M., Berlet, R.
Morphologie und funktionelle Charakteristika der Blutmonozyten
beim Gesunden und bei Patienten mit Monozytose
In: Monozytopoese beim Menschen, Hämatologie und Bluttransfusion
13, (W. Stich und G. Ruhenstroth-Bauer, Eds.), S. 83,
J. F. Lehmanns-Verlag, München
1974

- 287 : Micklem, H. S., Ford, C. E., Evans, E. P., Gray, J.
Interrelationships of myeloid and lymphoid cells: studies with
chromosome-marked cells transfused into lethally irradiated mice
Proc. Roy. Soc. Biol. 165, 78-102
1966
- 288 : Miller, A. M., Page, P. L., Hartwell, B. L., Robinson, S. H.
Inhibition of growth of normal murine granulocytes by cocultured
acute leukemic cells
Blood 50, 799-809
1977
- 289 : Miller, A. M., Marmor, J. B., Page, P. L., Russell, J. L.,
Robinson, S. H.
Unregulated growth of murine leukemic cells and suppression of
normal granulocyte growth in diffusion chamber culture
Blood 47, 737-745
1976
- 290 : Minowada, J., Janossy, G., Greaves, M. F., Tsubota, T.,
Srivastava, S. B. I., Morikawa, S., Tatsumi, E.
Expression of an antigen associated with acute lymphoblastic
leukemia in human leukemia lymphoma cell lines
J. Natl. Canc. Inst. 60, 1269-1277
1978
- 291 : Minowada, J., Ohnuma, T., Moore, G. E.
Rosette-forming human lymphoid cell lines. I. Establishment and
evidence for origin of thymus-derived lymphocytes
J. Nat. Cancer Inst. 49, 891-895
1972
- 292 : Moloney, W. C., McPherson, K., Fliegelman, L.
Esterase activity in leukocytes demonstrated by the use
of naphthol-AS-D-chloroacetate substrate
J. Histochem. Cytochem. 8, 200-207
1960
- 293 : Moloney, W. C., Rosenthal, D. S.
Treatment of early acute nonlymphatic leukemia with low dose
cytosine arabinoside
In: Modern trends in human leukemia IV. (R. Neth, R. C. Gallo,
T. Graf, K. Mannweiler und K. Winkler, Eds.), S. 59-62,
Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York
1981
- 294 : Moore, M. A. S., Williams, N.
In: Hemopoiesis in Culture (W. A. Robinson, Ed.), S. 17-27
DHEW Publications, Washington, D.C.
1974
- 295 : Morris, T. C. M., Butler, M., Muldrew, J. G., McNeill, T. A.,
Bridges, J. M.
Changes in granulopoiesis detected by in vitro colony formation
in acute lymphatic leukaemia
Br. J. Cancer 35, 868-874
1977

- 296 : Morris, T. C., McNeill, T. A., Bridges, J. M.
Inhibition of normal in vitro colony-forming cells by cells
from leukaemic patients
Br. J. Cancer 31, 641-647
1975
- 297 : Nadler, L. M., Korsmeyer, S. J., Anderson, K. C., Boyd, A. W.,
Slaughenhaupt, B., Park, E., Jensen, J., Coral, F., Mayer, R.
J., Sallan, S. E., Ritz, J., Schlossman, F. B.
B cell origin of non-T cell acute lymphoblastic leukemia. A
model for discrete stages of neoplastic and normal pre-B cell
differentiation
J. Clin. Invest. 74, 332-340
1984
- 298 : Nadler, L. M., Ritz, J., Bates, M. P., Park, E. K., Anderson, K.
C., Sallan, S., Schlossman, S. R.
Induction of human B cell antigens in non-T cell acute leukemia
J. Clin. Invest. 70, 433-442
1982
- 299 : Nadler, L. M., Reinherz, E. L., Schlossman, S. F.
The T lymphoblastic malignancies
Cancer Chemother. Pharmacol. 4, 11-15
1980
- 300 : Nakahata, T., Ogawa, M.
Identification in culture of a class of hemopoietic colony-
forming units with extensive capability to self-renew and
generate multipotential colonies
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 79, 3843-3847
1982
- 301 : Nakahata, T., Ogawa, M.
Clonal origin of murine hemopoietic colonies with apparent
restriction to granulocyte-macrophage-megakaryocyte (GMM)
differentiation
J. Cell. Physiol. 111, 239-246
1982
- 302 : Nakahata, T., Gross, A. J., Ogawa, M.
A stochastic model of self-renewal and commitment to
differentiation of the primitive hemopoietic stem cells in
culture
J. Cell. Physiol. 113, 455-458
1982
- 303 : Nakahata, T., Tsuji, K., Ishiguro, A., Ando, O., Norose, M.,
Koike, K., Akabane, T.
Single-cell origin of human mixed hemopoietic colonies
expressing various combinations of cell lineages
Blood 65, 1010-1016
1985
- 304 : Nakahata, T., Ogawa, M.
Hemopoietic colony-forming cells in umbilical cord blood with
extensive capability to generate mono- and multipotential
hemopoietic progenitors
J. Clin. Invest. 70, 1324-1328
1982

- 305 : Neame, P. B., Soamboonsrup, P., Brownab, G., Barr, R. D., Saeed, M., Chan, B., Pal, M., Bengner, A., Wilson, W. E. C., Walker, I. R., McBride, J. A.
Simultaneous or sequential expression of lymphoid and myeloid phenotypes in acute leukemia
Blood 65, 142-148
1985
- 306 : Nettesheim, P., Makinodan, T., Chadwick, C. J.
Improved diffusion chamber cultures for cytokinetic analysis of antibody response
Immunology 11, 427-439
1966
- 307 : Netzel, B., Rodt, H., Haas, R. J., Janka, G., Thierfelder, S.
The concept of antileukemic, autologous bone marrow transplantation in acute lymphoblastic leukemia
In: Immunobiology of bone marrow transplantation (S. Thierfelder H. Rodt, H. J. Kolb, Eds.), S. 297-307,
Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York
1980
- 308 : Netzel, B., Rodt, H., Thiel, E., Haas, R. J., Thierfelder, S.
Use of specific antisera against leukemia-associated antigens in the diagnosis of childhood acute lymphoblastic leukemia
Acta Haematol. 61, 177-183
1979
- 309 : Netzel, B., Rodt, H., Hoffmann-Fezer, G., Thiel, E., Thierfelder, S.
The effect of crude and differently absorbed anti-human T-cell globulin on granulocytic and erythropoietic colony formation
Exp. Hematol. 6, 410-420
1978
- 310 : Netzel, B., Rodt, H., Lau, B., Thiel, E., Haas, R. J., Dörmer, P., Thierfelder, S.
Transplantation of syngeneic bone marrow incubated with leukocyte antibodies: II. Cytotoxic activity of anti-cALL globulin on leukemic cells and normal hemopoietic precursor cells in man
Transplantation 26, 157-161
1978
- 311 : Neudorf, S. M. L., LeBien, T. W., Kersey, J. H.
Characterization of thymocytes expressing the common acute lymphoblastic leukemia antigen
Leuk. Res. 8, 173-179
1984
- 312 : Newman, R. A., Greaves, M. F.
Characterization of HLA-DR antigens on leukemic cells
Clin. Exp. Immunol. 50, 41-50
1982

- 313 : Newman, R. A., Sutherland, R., Greaves, M. F.
The biochemical characterization of a cell surface antigen
associated with acute lymphoblastic leukemia and lymphocyte
precursors
J. Immunol. 126, 2026-2030
1981
- 314 : Nicola, M. A., Metcalf, D., von Melchner, H., Burgess, A. W.
Isolation of murine fetal hemopoietic progenitor cells and
selective fractionation of various erythroid precursors
Blood 58, 376-386
1981
- 315 : Minane, J., Canon, J.-L., Cornu, G., Rodhain, J., Stein, F.,
Symann, M.
Effect of Lithium on diffusion chamber granulopoiesis
Int. J. Cell Cloning 2, 216-226
1984
- 316 : Niskanen, E., Cline, M. J.
Differentiation of subpopulations of human and murine
hemopoietic stem cells by hypotonic lysis
J. Clin. Invest. 65, 285-289
1980
- 317 : Niskanen, E., Wells, J. R., Golde, D. W., Cline, M. J.
Separation by velocity sedimentation of human haemopoietic
precursors forming colonies in vivo and in vitro cultures
Cell Tissue Kinet. 18, 399-406
1985
- 318 : Niskanen, E., Tyler, W. S., Symann, M., Stohlman, F., Jr.,
Howard, D.
The effect of neutropenia on the cell cycle of granulocyte
precursors in an in vivo culture system
Blood 43, 23-31
1974
- 319 : Niskanen, E. O., Wells, J. R., Quesenberry, P. J., Cline, M. J.
Effect of cryopreservation on recovery of cells forming colonies
in diffusion chambers in mice (CFU-D)
Exp. Hematol. 9, 411-414
1981
- 320 : Niskanen, E., Olofsson, T., Cline, M. J.
Hemopoietic precursor cells in human peripheral blood
Am. J. Hemat. 7, 201-206
1979
- 321 : Niskanen, E., Wyandt, H.
Potentiality of the murine colony-forming cells detected by an
in vivo diffusion chamber culture system
Blood 66, 686-689
1985
- 322 : Niskanen, E., Oki, A., Cline, M. J., Golde, D. W.
Human T-lymphocyte products stimulate human hemopoietic
progenitor cell proliferation in DC in vivo
Blood 60, 368-372
1982

- 323 : Niskanen, E., Kallio, A., McCann, P. P., Baker, D. G.
The role of polyamine biosynthesis in hematopoietic precursor
cell proliferation in mice
Blood 61, 740-745
1983
- 324 : Niskanen, E., Rahman, R.
Distinction of human T-cell line (HUT-102)-derived activity
stimulating granulocytic colony formation in diffusion chambers
in vivo from activities stimulating erythroid and mixed-colony
formation in vitro
Cancer Res. 45, 3493-3496
1985
- 325 : Niskanen, E.
Assessment of early hemopoiesis in in vivo diffusion chamber
cultures
In: Stem Cell Physiology, Proceedings of the Tenth Annual
Frederick Stohlman Jr. M.D. Memorial Symposium, (J. Palek, Ed.),
S. 189, Liss., New York
1985
- 326 : Niskanen, E., Cline, M. J.
Growth of mouse and human bone marrow in diffusion chambers in
mice: Development of myeloid and erythroid colonies and
proliferation of myeloid stem cells in cyclophosphamide- and
erythropoietin- treated mice
Cell Tissue Kinet. 12, 59-70
1979
- 327 : Niskanen, E., Sarngadharan, M. J.
Formation of multipotential colonies in vitro (CFU-GEMM) and
granulocytic colonies in vivo (CFU-DG) from human marrow is
stimulated by separate factors
Blood 62, 463
1983
- 328 : Niskanen, E., Pirsch, G.
Effect of cooling rate on human and murine hemopoietic precursor
cell recovery
Cryobiology 20, 401-406
1983
- 329 : Niskanen, E., Squires, J.
Corticosteroid effect on murine hemopoietic precursor cells in
vivo
Blood 57, 1138-1139
1981
- 330 : Nowell, P. C., Hungerford, D. A.
A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia
Science 132, 1497
1960
- 331 : Okamura, J., Letarte, M., Gelfand, E. W.
Heterogeneity of non-T, non-B acute lymphocytic leukemia defined
by the quantitative expression of Ia and common ALL antigens
Leuk. Res. 8, 335-343
1984

- 332 : Olofsson, T., Cline, M. J.
Inhibitor of hematopoietic cell proliferation derived from a
human leukemic cell line
Blood 52, 143-152
1978
- 333 : Olofsson, T., Olsson, I.
Suppression of normal granulopoiesis in vitro by a leukemia
associated inhibitor (LAI) derived from human promyelocytic
cell line (HL-60)
Leuk. Res. 4, 437-447
1980
- 334 : Olofsson, T., Olsson, I.
Biochemical characterization of a leukemia-associated inhibitor
(LAI) suppressing normal granulopoiesis in vitro
Blood 55, 983-991
1980
- 335 : Orgad, S., Yunis, E. J., Zaizov, R., Ramot, B., Altshuler, R.,
Gazit, E.
Expression of HLA-DR alloantigens on acute lymphoblastic
leukemia lymphoblasts
Hum. Immunol. 9, 67-74
1984
- 336 : Pachmann, K., Penning, R., Lau, B., Rodt, H., Dörmer, P.
Characterization of normal human mononuclear blood cells
during diffusion chamber (DC) culture with respect to
proliferation and expression of T-cell antigen
Scand. J. Haematol. 28, 197-204
1982
- 337 : Pachmann, K., Penning, R., Lau, B., Dörmer, P.
Detection of cALLA positive cells in the human normal peripheral
blood by microimmunofluorometry and their fate during
cultivation in diffusion chambers
Scand. J. Haematol. 30, 257-264
1983
- 338 : Paietta, E., Dutcher, J. P., Wiernik, P. H.
Terminal transferase positive acute promyelocytic leukemia:
In vitro differentiation of a T-lymphocytic/promyelocytic
hybrid phenotype
Blood 65, 107-114
1985
- 339 : Parkin, J. L., Arthur, D. C., Abramson, C. S., McKenna, R. W.,
Kersey, J. H., Heideman, R. L., Brunning, R. D.
Acute leukemia associated with the t(4;11) chromosome
rearrangement: Ultrastructural and immunologic characteristics
Blood 60, 1321-1331
1982
- 340 : Paulus, J. M., Carsten, A. L., Cronkite, E. P., Lacaze, M.
Megakaryocyte growth in in vitro cultures and in diffusion
chambers
In: Diffusion chamber culture. Hemopoiesis, cloning of tumors,
cytogenetic and carcinogenetic assays (A. Carsten, E. Cronkite,
Eds.), S. 57-62, Springer Verlag, Berlin
1980

- 341 : Perentesis, J., Ramsay, M. K. C., Brunning, R., Kersey, J. H., Filipovitch, A. H.
Biphenotypic leukemia: Immunologic and morphologic evidence for a common lymphoid-myeloid progenitor in humans
J. Pediatr. 102, 63-67
1983
- 342 : Pesando, J. M., Tomaselli, K. J., Lazarus, H., Schlossman, S. F.
Distribution and modulation of a human leukemia-associated antigen (CALLA)
J. Immunol. 131, 2038-2045
1983
- 343 : Petersen, H. B., Meyer, T., Tjernshaugen, H.
Kinetics of rat bone marrow cells cultured in diffusion chambers: Effect of heterologous implantation and irradiation of the host
Scand. J. Haematol. 13, 39
1974
- 344 : Pfanzagl, J.
Allgemeine Methodenlehre der Statistik II: Höhere Methoden unter besonderer Berücksichtigung der Anwendungen in Naturwissenschaften, Medizin und Technik
de Gruyter Berlin, New York
1978
- 345 : Phillips, R. A.
The hemopoietic system as a model for studies on determination and regulation of differentiation
In: Cell Lineage, Stem Cells and Cell Determination (N. Le Douarin, Ed.), INSERM Symposium No. 10, Elsevier, North-Holland
1979
- 346 : Pike, B. L., Robinson, W. A.
Human bone marrow colony growth in agar-gel
J. Cell. Physiol. 76, 77-84
1970
- 347 : Platt, J. L., LeBien, T. W., Michael, A. F.
Stages of renal ontogenesis identified by monoclonal antibodies reactive with lymphohemopoietic differentiation antigens
J. Exp. Med. 157, 155-172
1983
- 348 : Pluznik, D. H., Sachs, L.
The cloning of normal "mast" cells in tissue culture
J. cell. comp. Physiol. 66, 319-324
1966
- 349 : Pojda, Z., Viktor-Jedrzejczak, W.
Effect of erythropoietic stimulation of the chamber host on the growth of haemopoietic colonies in plasma clot diffusion chambers (PCDC)
Cell Tissue Kinet. 18, 347-353
1985

- 350 : Powell, J. S., Fialkow, P. J., Adamson, J. W.
Human mixed cell colonies: unicellular or multicellular origin-
analysis by G-6-PD
Brit. J. Haematol. 57, 89-95
1984
- 351 : Prchal, J. T., Throckmorton, D. W., Carroll, A. J., Fuson,
E. W., Gams, R. A., Prchal, J. F.
A common progenitor for human myeloid and lymphoid cells
Nature 274, 590-591
1978
- 352 : Preisler, H. D., von Fliedner, V., Shoham, D.
Growth of human marrow in plasma clot diffusion chambers
Scand. J. Haematol. 21, 313-317
1978
- 353 : Prentice, A. G., Smith, A. G., Bradstock, K. F.
Mixed lymphoblastic-myelomonoblastic leukemia in treated
Hodgkin's disease
Blood 56, 129-133
1980
- 354 : Pui, C.-H., Dahl, G. V., Melvin, S., Williams, D. L., Peiper,
S., Mirro, J., Murphy, S. B., Stass, S.
Acute leukaemia with mixed lymphoid and myeloid phenotype
Br. J. Haematol. 56, 121-130
1984
- 355 : Quesenberry, P., Miskanen, E., Symann, M., Howard, D., Ryan, M.,
Halpern, J., Stohlman, F., Jr.
Growth of stem cell concentrates in diffusion chambers (DC)
Cell Tissue Kinet. 7, 337-348
1974
- 356 : Quesenberry, P. J., Rappeport, J. M., Fontebuoni, A., Sullivan,
R., Zuckerman, K., Ryan, M.
Inhibition of normal murine hematopoiesis by leukemic cells
N. Engl. J. Med. 299, 71-75
1978
- 357 : Ragab, A. H., Gilkerson, E. S., Myers, M. L.
Granulopoiesis in childhood leukemia
Cancer 33, 791-797
1974
- 358 : Reiffers, J., Broustet, A., Goldman, J. M.
Philadelphia Chromosome-negative progenitors in chronic
granulocytic leukemia
N. Engl. J. Med. 309, 1460
1983
- 359 : Reinherz, E. L., Kung, P. C., Goldstein, G., Levey, R. H.,
Schlossman, S. F.
Discrete stages of human intrathymic differentiation: analysis
of normal thymocytes and leukemic lymphoblast of T-lineage
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 1588-1592
1980

- 360 : Reinherz, E. L., Kung, P. C., Pesando, J. M., Ritz, J., Goldstein, G., Schlossman, S. F.
la determinants on human T-cell subsets defined by monoclonal antibody. Activation stimuli required for expression
J. exp. Med. 150, 1472-1482
1979
- 361 : Rezzesi, F. D.
Eine Methode zur Züchtung der Gewebe in vivo
Archiv f. Exper. Zellforschung 13, 258-281
1932
- 362 : Rifkind, R. A.
Acute leukemia and cell differentiation
N. Engl. J. Med. 315, 56-57
1986
- 363 : Ritz, J., Pesando, J. M., Notis-McConarty, J., Lazarus, H., Schlossman, S. F.
A monoclonal antibody to human acute lymphoblastic leukaemia antigen
Nature 283, 583-585
1980
- 364 : Ritz, J., Nadler, L. M., Bhan, A. K., Notis-McConarty, J., Pesando, J. M., Schlossman, S. F.
Expression of common acute lymphoblastic leukemia antigen (CALLA) by lymphomas of B-cell and T-cell lineage
Blood 58, 648-652
1981
- 365 : Roberts, M., Greaves, M. F., Janossy, G., Sutherland, R., Pain, C.
Acute lymphoblastic leukemia (ALL) associated antigen.
I. Expression in different hematopoietic malignancies
Leuk. Res. 2, 105-114
1978
- 366 : Robinson, W. A., Kurnick, J. E., Pike, B. L.
Colony growth of human leukemic peripheral blood cells in vitro
Blood 38, 500-508
1971
- 367 : Rodt, H., Metzger, B., Thiel, E., Jäger, G., Huhn, D., Haas, R., Götze, D., Thierfelder, S.
Classification of leukemic cells with T- and O-ALL-specific antisera
In: Immunological Diagnosis of Leukemias and Lymphomas
(S. Thierfelder, H. Rodt und E. Thiel, Eds.), S. 87-96, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York
1977
- 368 : Roper, M., Crist, W. M., Metzger, R., Ragab, A. H., Smith, S., Starling, K., Pullen, J., Leventhal, B., Bartolucci, A. A., Cooper, M. D.
Monoclonal antibody characterization of surface antigens in childhood T-cell lymphoid malignancies
Blood 61, 830
1983

- 369 : Rosenfeld, C., Goutner, A., Choquet, C., Venuat, A.M.,
Kayibanda, B., Pico, J.L.
Phenotypic characterization of a unique non-T, non-B acute
lymphoblastic leukemia cell line
Nature 267, 841-843
1977
- 370 : Rosenfeld, C., Venuat, A.M., Goutner, A., Guegang, J.,
Choquet, C., Tron, F., Pico, J.L.
An exceptional cell line established from a patient with acute
lymphoid leukemia
Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 16, 1075
1975
- 371 : Rozenszajn, L. A., Shoham, D., Kalechman, Y.
Clonal proliferation of PHA-stimulated human lymphocytes in soft
agar culture
Immunology 29, 1041-1055
1975
- 372 : Rozenszajn, L. A., Kalechman, Y., Danziger, J., Michlin, H.
Colony formation of thymic cell populations in vitro
In: Experimental Hematology Today 1982 (S. J. Baum, G. D.
Ledney und S. Thierfelder, Eds.), S. 71-79, Karger Verlag, Basel
1982
- 373 : Russell, E. S.
Hereditary anemias of the mouse: a review for geneticists
Adv. Genetics 20, 357-459
1979
- 374 : Sachs, L.
The differentiation of myeloid leukemia cells: new possibilities
for therapy
Br. J. Haematol. 40, 509-517
1978
- 375 : Sachs, L.
Constitutive uncoupling of pathways of gene expression that
control growth and differentiation in myeloid leukemia: A model
for the origin and progression of malignancy
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 6152-6156
1980
- 376 : Sakurai, M., Sampi, K., Hozumi, M.
Possible differentiation of human acute myeloblastic leukemia
cells by daily and intermittent administration of
aclacinomycin-A
Leuk. Res. 7, 139-143
1983
- 377 : Sarin, P. S., Anderson, P. N., Gallo, R. C.
Terminal deoxynucleotidyl transferase activities in human blood
leukocytes and lymphoblast cell lines: High level in lymphoblast
cell lines and in blast cell of some patients with CML in acute
phase
Blood 47, 11-20
1976

- 378 : Schlossman, S. F., Chess, L., Humphreys, R. E., Strominger, J. L.
Distribution of Ia-like molecules on the surface of normal and leukemic human cells
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 1288-1292
1976
- 379 : Schrader, J. W., Lewis, S. J., Clark-Lewis, I., Culvenor, J. G.
The persisting (P) cell: Histamine content, regulation by a T cell-derived factor, origin from a bone marrow precursor and relationship to mast cells
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78, 323-327
1981
- 380 : Schrader, J. W., Schrader, S.
In vitro studies on lymphocyte differentiation I. Long term in vitro culture of cells giving rise to functional lymphocytes in irradiated mice
J. Exp. Med. 148, 823-828
1978
- 381 : Schwartz, E. L., Brown, B. J., Nierenburg, M., Marsh, J. C., Sartorelli, A. C.
Evaluation of some anthracycline antibiotics in an in vivo model for studying drug-induced human leukemia cell differentiation
Cancer Res. 43, 2725-2730
1983
- 382 : Senn, J. S., McCulloch, E. A., Till, J. E.
Comparison of colony-forming ability of normal and leukemic marrow in cell culture
Lancet ii, 597-598
1967
- 383 : Shadduck, R. K., Carsten, A. L., Chikkappa, G., Cronkite, E. P., Gerard, E.
Inhibition of diffusion chamber (DC) granulopoiesis by anti-CSF serum
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 158, 542-549
1978
- 384 : Shulman, L. H., Robinson, S. H.
Maintenance of hemopoietic stem cells in diffusion chamber cultures
J. Lab. Clin. Med. 90, 581-588
1977
- 385 : Siminovitch, L., McCulloch, E. A., Till, J. E.
The distribution of colony-forming cells among spleen colonies
J. Cell. Comp. Physiol. 62, 327-336
1963
- 386 : Singer, J. W., Keating, A., Cuttner, J., Gown, A., Jacobson, R., Killen, P. D., Moehr, J. W., Majfeld, V., Powell, J., Sanders, J., Striker, G. W., Fialkow, P. J.
Evidence for a stem cell common to hematopoiesis and its in vitro microenvironment: Studies of patients with clonal hematopoietic neoplasia
Leuk. Res. 8, 535-545
1981

- 387 : Smith, L. J., McCulloch, E. A.
Phenotypic heterogeneity in lymphoblastic cell lines
J. Cell. Physiol. 127, 229-236
1986
- 388 : Springer, T. A., Kaufmann, J. F., Terhorst, C.,
Strominger, J. L.
Purification and structural characterization of human HLA-linked
B-cell antigens
Nature 268, 213-218
1977
- 389 : Srivastava, B. I. S., Koga, M., Srivastava, P.
Phorbol ester-induced differentiation of a non-T non-B human
leukemic cell line (Reh) to macrophage-like cells
Cancer Res. 44, 3017-3021
1984
- 390 : Stass, S., Mirro, J., Melvin, S., Pui, Ching-Hon., Murphy, S.
B., Williams, D.
Lineage switch in acute leukemia
Blood 64, 701-706
1984
- 391 : Stass, S. A., Veach, S., Pasquale, S. M., Schumacher, H. R.,
Keneklis, T. P., Bollum, F. J.
Terminal-Deoxynucleotidyl-Transferase positive acute
lymphoblastic leukaemia with Auer Rods
Lancet, 1042-1043
1978
- 392 : Steinberg, H. N., Page, P. L., Robinson, S. H.
Two classes of murine granulocyte progenitor cells expressed in
plasma clot diffusion chamber cultures
Blood 59, 838-843
1982
- 393 : Steinberg, H. N., Handler, E. S.
Leukemic host influence on normal erythrocytic and granulocytic
colony formation in in vivo plasma clot diffusion chamber
cultures
Cancer Res. 39, 1575-1578
1979
- 394 : Steinberg, H. N., Handler, E. S., Handler, E. E.
Assessment of erythrocytic and granulocytic colony formation in
an in vivo plasma clot diffusion chamber culture system
Blood 47, 1041-1051
1976
- 395 : Steinberg, H. N., Tsiftoglou, A. S., Robinson, S. H.
Loss of suppression of normal bone marrow colony formation by
leukemic cell lines after differentiation is induced by chemical
agents
Blood 65, 100-106
1985

- 396 : Stephenson, J. R., Axelrad, A. A.
Separation of erythropoietin-sensitive cells from hemopoietic
spleen colony-forming stem cells of mouse fetal liver by unit
gravity sedimentation
Blood 37, 417-427
1971
- 397 : Stephenson, J. R., Axelrad, A. A., McLeod, D. L., Shreeve, M. M.
Induction of colonies of hemoglobin-synthesising cells by
erythropoietin in vitro
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 68, 1542-1546
1971
- 398 : Stong, R. C., Korsmeyer, S. J., Parkin, J. L., Arthur, D. C.,
Kersey, J. H.
Human acute leukemia cell line with the t(4;11) chromosomal
rearrangement exhibits B lineage and monocytic characteristics
Blood 65, 21-31
1985
- 399 : Sugimoto, T., Tatsumi, E., Kemshead, J. T., Helson, L., Green,
A. A., Minowada, J.
Determination of cell surface membrane antigens common to both
human neuroblastoma and leukemia-lymphoma cell lines by a panel
of monoclonal antibodies
J. Natl. Cancer Inst. 73, 51-57
1984
- 400 : Tepperman, A. D., Curtis, J. E., McCulloch, E. A.
Erythropoietic colonies in cultures of human marrow
Blood 44, 659-669
1974
- 401 : Thiel, E., Lau, B., Rodt, H., Pachmann, K.
Appearance of B- or T-lymphocyte markers after diffusion chamber
culture of acute lymphoblastic leukemia cells
Blut 42, 315-322
1981
- 402 : Thiel, E., Rodt, H., Huhn, D., Netzel, B., Grosse-Wilde, H.,
Ganeshaguru, K., Thierfelder, S.
Multimarker classification of acute lymphoblastic leukemia:
evidence for further T subgroup and evaluation of their clinical
significance
Blood 56, 759-772
1980
- 403 : Thiel, E., Rodt, H., Netzel, B., Huhn, D., Wündisch, G. F.,
Haas, R. J., Bender-Götze, Ch., Thierfelder, S.
T-Zell-Antigen positive, E-Rosetten negative akute
Lymphoblastenleukämie
Blut 36, 363-369
1978
- 404 : Till, J. E., McCulloch, E. A.
Hemopoietic stem cell differentiation
Biochim. Biophys. Acta 605, 431-459
1980

- 405 : Till, J. E., McCulloch, E. A., Siminovitch, L.
A stochastic model of stem cell proliferation, based on the
growth of spleen-colony forming cells
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 51, 29-36
1964
- 406 : Till, J. E., McCulloch, E. A.
A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse
bone marrow cells
Radiat. Res. 14, 213-222
1961
- 407 : Toksoz, D., Dexter, T. M., Lord, B. I., Wright, E. G., Lajtha, L. G.
The regulation of hemopoiesis in long-term bone marrow cultures
II. Stimulation and inhibition of stem cell proliferation
Blood 55, 931-936
1980
- 408 : Tonegawa, S.
Somatic generation of antibody diversity
Nature 302, 575-581
1983
- 409 : Trentin, J., Wolf, M., Cheng, V.
Antibody production by mice repopulated with limited numbers of
clones of lymphoid cell precursors
J. Immun. 98, 1326-1337
1967
- 410 : Trentin, J. J.
Influence of hematopoietic organstroma (Hematopoietic Inductive
Microenvironments) on stem cell differentiation
In: Regulation of Hematopoiesis (A. S. Gordon, Ed.), S. 161
Appleton-Century-Crofts, New York
1970
- 411 : Trepel, F.
Das lymphatische Zellsystem: Struktur, allgemeine Physiologie
und allgemeine Pathophysiologie
In: Handbuch der Inneren Medizin, Bd. II/3, (H. Schwiégk, Ed.),
S. 1, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York
1976
- 412 : Tyler, W. S., Niskanen, E., Stohlman, F. Jr., Keane, J., Howard, D.
The effect of neutropenia on myeloid growth and the stem cell in
an in vivo culture system
Blood 40, 634-644
1972
- 413 : Ueda, T., Kita, K., Kagawa, D., Tamori, S., Ando, S., Sasada, M., Yoshida, Y., Uchino, H., Nakamura, T.
Acute leukemia with two cell population of lymphoblasts and
monoblasts
Leuk. Res. 8, 63-69
1984

- 414 : Vainchenker, W., Bouguet, J., Guichard, J., Breton-Gorius, J.
Megakaryocyte colony formation from human bone marrow precursors
Blood 54, 940-945
1979
- 415 : Van den Engh, G., Russell, J., de Cicco, D.
In: Experimental Hematology Today (Baum, S. S., Ledney, G. D.,
Eds.), S. 9-15, Springer Verlag, Berlin-New York
1978
- 416 : van Furth, R., Langevoort, H. L., Schaberg, A.
Mononuclear phagocytes in human pathology - proposal for an
approach to improved classification
In: Mononuclear phagocytes in immunity, Infection and Pathology
(R. V. Furth, Ed.), S. 1, Blackwell, Oxford
1975
- 417 : VanZant, G., Goldwasser, E.
Competition between erythropoietin and colony-stimulating factor
for target cells in mouse marrow
Blood 53, 946-965
1979
- 418 : VanZant, G., Goldwasser, E.
Simultaneous effects of erythropoietin and colony stimulating
factor on bone marrow cells
Science 198, 733-735
1977
- 419 : Vogler, L. B., Christ, W. M., Bockman, D. E., Pearl, E. R.,
Lawton, A. R., Cooper, M. D.
Pre-B-cell leukemia. A new phenotype of childhood lymphoblastic
leukemia
N. Engl. J. Med. 298, 872
1978
- 420 : Von Flidner, V.
Contribution of immunological markers to the diagnosis and
prognosis of human leukemia
Eur. J. Cancer Clin. Oncol. 21, 347-353
1984
- 421 : Walther, F., Schopow, K.
Human erythropoiesis in diffusion chambers
Scand. J. Haematol. 23, 367-372
1979
- 422 : Weaver, J. M., Algire, G. H., Prehn, R. T.
The growth of cells in vivo in diffusion chambers. II. The
role of cells in the destruction of homografts in mice
J. Natl. Cancer Inst. 15, 1737-1767
1955
- 423 : Veh, H. J., Zschaber, R., Hossfeld, D. K.
Low-dose cytosine-arabioside in the treatment of acute myeloid
leukemia (AML) and myelodysplastic syndrome (MDS)
Blut 48, 239-242
1984

- 424 : Willemze, R., Walker, I. R., Herion, J. C., Palmer, J. G.
Marrow culture in diffusion chambers in rabbits. I. Effect of
mature granulocytes on cell production
Blood 51, 21-31
1978
- 425 : Winchester, R. J., Ross, G. D., Jarowski, C. I., Wang, C. Y.,
Halper, J., Broxmeyer, H. E.
Expression of Ia-like antigen molecules on human granulocytes
during early phases of differentiation
Proc. Natl. Sci. USA 74, 4012-4016
1977
- 426 : Winchester, R. J., Wang, C. Y., Halper, J., Hoffmann, T.
Studies with B-cell allo- and hetero-antisera: parallel
reactivity and special properties
Scand. J. Haematol. 5, 745-757
1976
- 427 : Winchester, R. J., Fu, S. M., Wernet, P., Kunkel, H. G., Dupont,
B., Jersild, C.
Recognition by pregnancy serums of non HLA-alloantigens
selectively expressed on B lymphocytes
J. Exp. Med. 141, 924-929
1975
- 428 : Winchester, R. J., Meyers, P. A., Broxmeyer, H. E., Wang, C. Y.,
Moore, M. A. S., Kunkel, H. G.
Inhibition of human erythropoietic colony formation in culture
by treatment with Ia antisera
J. Exp. Med. 148, 613-618
1978
- 429 : Wintrobe, M. M., Lee, G. R., Boggs, D. R., Bithell, T. C.,
Athens, J. W., Foerster, J.
Clinical Hematology
seventh edition, Lea and Febiger, Philadelphia
1975
- 430 : Worton, R. G., McCulloch, E. A., Till, J. E.
Physical separation of hemopoietic stem cells differing in their
capacity for self-renewal
J. Exp. Med. 130, 91-103
1969
- 431 : Worton, R. G., McCulloch, E. A., Till, J. E.
Physical separation of hemopoietic stem cells from cells forming
colonies in culture
J. Cell. Physiol. 74, 171-182
1969
- 432 : Wu, A. M., Till, J. E., Siminovitch, L., McCulloch, E. A.
A cytological study of the capacity for differentiation of
normal hemopoietic colony-forming cells
J. Cell. Physiol. 69, 177-184
1967

- 433 : Wu, A. M., Till, J. E., Siminovitch, L., McCulloch, E. A.
Cytological evidence for a relationship between normal
hematopoietic colony-forming cells and cells of the lymphoid
system
J. Exp. Med. 127, 455-464
1968
- 434 : Biphentotypic leukaemia
Lancet ii, 1178-1179
1983

Danksagung

Mein persönlicher Dank gilt Frau Dr.med.habil Barbara Lau für die Themenstellung und Betreuung der Arbeit.

Herrn Prof.Dr.med. Peter Dörmer danke für die Möglichkeit meine Doktorarbeit in der von ihm geleiteten Abteilung für Experimentelle Hämatologie der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung mbH durchführen zu können.

Frau Dr.med. Gundula Jäger danke ich für die immunologische Charakterisierung der Zellen.

Herrn Priv.Doiz.Dr. Rodt danke ich für das AcALL-Antiserum.

Herrn Dr.med. Bruno Wetzel danke ich für die Bestimmung der CFU-C.

Allen medizinisch-technischen Assistentinnen, Frau Glas, Frau Maximiliane Greifenegger, Frau Anna-Maria Groß und Frau Sieglinde Patze danke ich für ihre qualifizierte Mitarbeit bei der Durchführung der Untersuchungen.

Frau Darsow und Frau Wochinger danke ich für ihren Rat zur Fixierung der CFU-DG.

Frau Sybille Steinbrück danke ich für ihre bibliothekarische Hilfe.

Herrn Daniel Just danke ich für seinen Rat in statistischen sowie computerspezifischen Fragen.

TABELLARISCHER LEBENS LAUF

Name: Ursula Just, geb. Lippl

Geburtsdatum: 08.08.60 in Freyung

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: verheiratet

Einschulung: Herbst 1966 in die Simmerschule in München

Schulabschluß: Abitur mit der Note 1,6 im Willi-Graf-Gymnasium in München im Juni 1979

Studium: Beginn des Medizinstudiums an der Ludwig-Maximilians Universität in München im WS 1979/80
Ärztliche Vorprüfung am 25.08.1981
Erster Teil der Ärztlichen Prüfung am 26.08.1982
Zweiter Teil der Ärztlichen Prüfung am 24.08.1984
Ärztliche Prüfung am 27.06.1986
Approbation als Arzt am 07.07.1986

Auslandsstudium: Universidade Nova de Lisboa in Portugal mit einem Stipendium des Deutschen Akademischen Austauschdienstes / Portugiesische Regierung im WS 1983/84 und SS 1984

Doktorarbeit: Übernahme einer Doktorarbeit am Institut für Hämatologie der GSF zum Jahresbeginn 1982 mit dem Thema "Entwicklung von granulozytären Zellen und Makrophagen während der Kultivierung von Zellen akuter lymphoblastischer Leukämien vom common-Typ in Diffusionskammern"

Aufbaustudium: Beginn des Aufbaustudiums Molekularbiologie im WS 1986/87 an der Universität Hamburg / Heinrich-Pette-Institut für Experimentelle Virologie und Immunologie bei Prof. Dr. Ostertag

Arbeitsverhältnis: Studentische Hilfskraft im Institut für Hämatologie der GSF in München vom 01.05.1980 bis zum 22.08.1983 und vom 01.08.1984 bis zum 28.02.1985.
Seit 1.2.87 wissenschaftliche Assistentin im Heinrich-Pette-Institut für Experimentelle Virologie und Immunologie in Hamburg

Hamburg, 13.6.1987

THE HISTORY OF THE UNITED STATES

1776	July 4th - Declaration of Independence
1787	September 17th - Constitution signed
1791	September 16th - Bill of Rights adopted
1800	January 17th - Capital moved to Washington
1803	April 30th - Louisiana Purchase
1812	August 21st - War of 1812 declared
1820	September 3rd - Missouri Compromise
1848	February 22nd - President Zachary Taylor dies
1850	September 9th - Compromise of 1850
1861	April 12th - Civil War begins
1863	September 17th - Battle of Gettysburg
1865	April 9th - Civil War ends
1877	March 30th - Reconstruction ends
1898	February 2nd - Spanish-American War begins
1901	September 6th - McKinley assassinated
1903	October 3rd - Panama Canal opens
1914	April 6th - U.S. enters WWI
1918	November 11th - WWI ends
1929	October 29th - Stock market crash
1933	March 22nd - Prohibition ends
1941	December 7th - Pearl Harbor attack
1945	September 2nd - WWII ends
1947	April 3rd - Cold War begins
1950	June 25th - Korean War begins
1954	July 1st - Civil Rights Act
1960	November 3rd - Kennedy elected
1963	November 22nd - JFK assassinated
1964	July 2nd - Civil Rights Act
1968	November 5th - Nixon elected
1970	April 4th - MLK assassinated
1972	November 3rd - Nixon re-elected
1974	August 9th - Nixon resigns
1976	November 2nd - Carter elected
1980	November 3rd - Reagan elected
1981	March 30th - Reagan assassinated
1982	October 12th - Iran-Contra scandal
1984	November 3rd - Reagan re-elected
1986	July 13th - Challenger launched
1988	November 3rd - Bush elected
1991	August 6th - Soviet Union collapses
1993	January 20th - Clinton elected
1994	November 3rd - Clinton re-elected
1996	November 3rd - Clinton re-elected
1997	January 20th - Clinton re-elected
1998	November 3rd - Clinton re-elected
1999	January 20th - Clinton re-elected
2001	January 20th - Bush elected
2003	March 20th - Iraq War begins
2004	November 3rd - Bush re-elected
2006	November 3rd - Obama elected
2008	November 3rd - Obama elected
2009	January 20th - Obama elected
2010	November 3rd - Obama re-elected
2011	September 11th - 9/11 anniversary
2012	November 3rd - Obama re-elected
2013	January 20th - Obama re-elected
2014	November 3rd - Obama re-elected
2015	January 20th - Obama re-elected
2016	November 3rd - Trump elected
2017	January 20th - Trump elected
2018	November 3rd - Trump re-elected
2019	January 20th - Trump re-elected
2020	November 3rd - Biden elected
2021	January 20th - Biden elected

